

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE
PÓS- GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS E FLORES DA *Spiranthera*
odoratissima A. St. Hil (Manacá)

Autor: Fernando Duarte Cabral
Orientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves
Coorientador: Dr. Mayker L. Dantas Miranda

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2020

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – IF GOIANO - CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE
PÓS- GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS E FLORES DA *Spiranthera*
odoratissima A. St. Hil (Manacá)

Autor: Fernando Duarte Cabral
Orientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves
Coorientador: Dr. Mayker L. Dantas Miranda

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica do
Instituto Federal Goiano – Campus Rio
Verde – como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM
AGROQUÍMICA.

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

CC117c Cabral, Fernando Duarte
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS E FLORES DA *Spiranthera*
odoratissima A. St. Hil (Manacá) / Fernando Duarte
Cabral; orientadora Cássia Cristina Fernandes Alves;
co-orientadora Mayker Lazaro Dantas Miranda. -- Rio
Verde, 2020.
57 p.

Dissertação (em Programa de Pós Graduação em
Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2020.

1. Tuberculose. 2. Leishmaniose. 3. Propriedades
inibidoras . 4. Plantas medicinais. 5. Manacá.. I.
Alves, Cássia Cristina Fernandes , orient. II.
Miranda, Mayker Lazaro Dantas, co-orient. III.
Título.

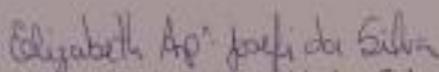
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADES DO ÓLEO
ESSENCIAL DE FOLHAS E FLORES DA *Spiranthera*
odoratissima A. St. Hil

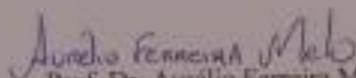
Autor: Fernando Duarte Cabral
Orientadora: Cássia Cristina Fernandes Alves

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2020.


Prof.ª Dr.ª Elizabeth Aparecida Josefi da
Silva
Avaliadora externa
AESGO / Rio Verde


Prof.ª Dr.ª Juliana Silva Rodrigues
Cabral
Avaliadora externa
AESGO / Rio Verde


Prof. Dr. Aurélio Ferreira Melo
Avaliador externo
AESGO / Rio Verde


Prof.ª Dr.ª Cássia Cristina Fernandes
Alves
Presidente da banca
IF Goiano / Campus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado suporte, força e conhecimento, para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família pela paciência e apoio durante esse período em que me dediquei ao trabalho, em especial à minha esposa Dilça Cabral de Jesus e meus filhos Enzo Gabriel Duate Cabral e Antonella Duarte Cabral.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves a quem tive a honra de conhecer, pelos conhecimentos passados a mim e pela disponibilidade de sempre me ajudar e com muito carinho e dedicação.

Agradeço também o meu coorientador Prof. Dr. Mayker L. Dantas Miranda pelo suporte e apoio nas pesquisas e no desenvolvimento do trabalho. Ao prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira pelo apoio e conhecimentos proporcionados.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais e demais laboratórios, em especial o amigo Rodrigo Sebastião Cruvinel Cabral e aos queridos alunos de Iniciação Científica os quais estiveram em meu auxílio nas pesquisas durante esses dois anos de mestrado.

Ao Instituto Federal Goiano e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade de estudo e desenvolvimento da pesquisa.

BIOGRAFIA DO AUTOR

FERNANDO DUATE CABRAL, filho de Rita Divina Duarte Cabral e João da Silva Cabral, nasceu na cidade de Rio Verde estado de Goiás no dia 21 de julho de 1983.

Iniciou a graduação em Fisioterapia pela Universidade de Rio Verde no ano de 2004 concluiu em 2007.

Pós-graduado em Fisioterapia Hospitalar e Fisioterapia Intensiva pela CDCS-Cambuí, Goiânia estado de Goiás no ano de 2012.

Atua como coordenador do curso de Fisioterapia na Faculdade UniBras, atuando como professor na disciplina de anatomia.

No ano de 2018 iniciou o mestrado em Agroquímica no Programa de Pós-graduação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus-Rio Verde.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADE	ix
RESUMO GERAL	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	14
1. <i>Spiranthera odoratissima</i>	14
2. Óleos essenciais	15
3. Tuberculose	17
4. Leishmaniose	18
5. Patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes de alimentos	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO I – Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais Extraídos de Folhas e Flores de <i>Spiranthera odoratissima</i> A. St. Hil. (Rutaceae)	25
RESUMO	25
1. Introdução	26
1.1. Fonte Vegetal	26
1.2. Estudos Prévios	26
2. Material e Métodos	26
2.1. Presente Estudo	26
3. Resultados	28

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO II- Atividade antibacteriana in vitro de óleos essenciais de <i>Spiranthera odoratissima</i> A. St. Hil. contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes de alimentos	31
RESUMO	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Material Vegetal e Extração dos Óleos Essenciais	33
2.2. Análises dos Óleos Essenciais	34
2.3. Atividade Antibacteriana	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Composição Química dos OE Extraídos	35
3.2. Atividade Antibacteriana dos OE Extraídos	37
4. DISCUSSÃO	37
4. CONCLUSÕES	40
5. REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO III – Bioatividade de óleos essenciais de diferentes partes de <i>Spiranthera odoratissima</i> (Rutaceae)	44
RESUMO	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Material Vegetal	47
2.2. Extração de Óleos Essenciais	47
2.3. Análises de CG/FID e CG/MS	48
2.4. Ensaio Antitubercular <i>in vitro</i>	48
2.5. Ensaio Antileishmanial <i>in vitro</i>	48
2.6. Ensaio Antiproliferativo <i>in vitro</i>	49
3. RESULTADOS	50
4. DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÕES	54
5. REFERÊNCIAS	54
CONCLUSÃO GERAL	57

ÍNDICE DE TABELAS

Páginas

CAPÍTULO I - Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais Extraídos de Folhas e Flores de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae).

Tabela 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil 28

CAPÍTULO II - Atividade antibacteriana in vitro de óleos essenciais de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes de alimentos.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima* 36

Tabela 2. Valores de CIM (mg/mL) dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima* 37

CAPÍTULO III - Bioatividades de óleos essenciais de diferentes partes de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae).

Tabela 1. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de folhas e flores de *S. odoratissima* contra *M. tuberculosis* 50

Tabela 2. Atividade antileishmanial de óleos essenciais de folhas e flores de *S. odoratissima* 51

Tabela 3. Atividade antiproliferativa de óleos essenciais de flores e folhas de *S. odoratissima* contra diferentes linhagens celulares 52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. <i>Spiranthera odoratissima</i> A. St. Hil., arbusto com flores e folhas	15
Figura 2. Biossíntese dos terpenos	16
Figura 3. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania amazonensis</i> na Amazônia brasileira	19

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

OE.....	Óleo essencial
CG.....	Cromatografia gasosa
CG/MS.....	Cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa
CG/FID.....	Cromatografia gasosa com detector de chama
IR _{exp}	Índice de retenção relativa
IR _{lit}	Índice de retenção encontrada na literatura
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
CI.....	Concentração inibitória
CIM.....	Concentração mínima inibitória
AR.....	Área relativa
IS.....	Índice de seletividade
DP.....	Desvio-padrão
mL/min.....	Mililitros por minuto
mL.....	Mililitros
µL.....	Microlitro
mg.....	Miligrama
eV.....	Eletrovolt
nm.....	Nanômetro
g.....	Gramma
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂	Gás hidrogênio
°C.....	Graus Celsius
MT.....	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB.....	Tuberculose
LV.....	Leishmaniose Visceral
HeLa.....	Adenocarcinoma cervical humano
DXR.....	Doxorrubicina
MCF-7.....	Adenocarcinoma de mama humano
M059J.....	Glioblastoma humano
HL-60.....	Leucemia humana

RESUMO

CABRAL, FERNANDO DUARTE. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde – GO, Fevereiro de 2020. **Composição química e bioatividade do óleo essencial de folhas e flores da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil.** Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves “Orientadora”, Mayker L. D. Miranda “Coorientador”.

Com a procura por tratamentos alternativos utilizando as plantas medicinais no combate a várias doenças, a *Spiranthera odoratissima* é uma espécie da família Rutaceae, amplamente encontrada no cerrado brasileiro e conhecida como manacá com propriedades medicinais utilizadas no tratamento de doenças renais, hepáticas, dores no estômago, musculares entre outros. Seu óleo essencial possui um componente principal o β -cariofileno que é um sesquiterpeno que possui atividade anti-inflamatória e atua também como neuroprotetor e possui também ação antibacteriana. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os constituintes químicos, a bioatividade do óleo essencial das folhas e flores da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil., e sua ação contra a tuberculose (TB) e a leishmaniose, as quais são doenças infecciosas que causam danos à saúde levando à morte. Para o desenvolvimento do trabalho, os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e caracterizados por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados da análise química do óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* A. St. Hil., representaram 93,8% do óleo e mostraram conter 28 componentes voláteis. Os principais componentes identificados foram β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%) e δ -cadineno (7,1%). A composição química do

óleo essencial das flores de *S. odoratissima* A. St. Hil., apresentaram 29 componentes voláteis que representam 94,4% da constituição total do óleo. Os principais constituintes foram β -cariofileno (14,1%), espatulenol (8,1%) e γ -cadineno (7,2%). Avaliou-se a atividade antimicrobacteriana dos OEs em termos da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os OEs (óleos essenciais) de folhas e flores mostraram atividade contra *M. tuberculosis*, com valores de CIM de 150 $\mu\text{g/mL}$ e 162,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, também apresentaram atividade antiparasitária contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, com valores de CI_{50} (50% de inibição do crescimento) de $14,36 \pm 2,02$ (OEs-folhas) e $19,89 \pm 2,66$ $\mu\text{g/mL}$ (OEs-flores). Observou-se atividade antiproliferativa contra todas as linhagens celulares tumorais humanas, com valores de CI_{50} significativamente inferiores aos obtidos para a linhagem celular normal, demonstrando valores de CI_{50} para a linhagem MCF-7 ($367,57 \pm 4,46$ $\mu\text{g/mL}$ para OEs folhas e $357,70 \pm 1,85$ $\mu\text{g/mL}$ para OEs flores) e M059J. O presente estudo mostrou a eficácia do OE de *Spiranthera odoratissima* contra microrganismos, no combate à TB (tuberculose) e leishmaniose, os componentes do seu óleo mostraram que podem ser utilizados em indústrias alimentícias, farmacêuticas e agroindustriais, sendo uma alternativa potencial ao uso de fórmulas sintéticas.

Palavras-chave: Tuberculose, leishmaniose, propriedades inibidoras, plantas medicinais, manacá.

ABSTRACT

CABRAL, FERNANDO DUARTE. Goiano Federal Institute of Science and Technology Education, Rio Verde Campus - GO, February 2020. **Chemical composition and bioactivity of the essential oil of leaves and flowers of *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil.** Dr. Cassia Cristina Fernandes Alves “Advisor”, Mayker L. D. Miranda “Coorientador”.

With the search for alternative treatments using medicinal plants to fight various diseases, *Spiranthera odoratissima* is a species of the Rutaceae family, widely found in the Brazilian cerrado and known as manacá with medicinal properties used in the treatment of kidney, liver and stomach pains, muscle and others. Its essential oil has a main component, β -karyophyllene, which is a sesquiterpene that has anti-inflammatory activity and also acts as a neuroprotective and also has antibacterial action. Thus, the present study aimed to evaluate the chemical constituents, the bioactivity of the essential oil of the leaves and flowers of *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil., And its action against tuberculosis (TB) and leishmaniasis, which are infectious diseases that cause health damage leading to death. For the development of the work, the essential oils were obtained by hydrodistillation and characterized by gas chromatography with flame ionization detector (CG-FID) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM). The results of the chemical analysis of the essential oil of the leaves of *S. odoratissima* A. St. Hil., Represented 93.8% of the oil and showed to contain 28 volatile components. The main components identified were β -karyophyllene (23.8%), bicyclogermacrene (10.8%) and δ -cadinene (7.1%). The chemical composition of the essential oil of the flowers of *S. odoratissima* A. St. Hil.,

Presented 29 volatile components that represent 94.4% of the total constitution of the oil. The main constituents were β -karyophyllene (14.1%), spatulenol (8.1%) and γ -cadinene (7.2%). The antimycobacterial activity of OEs was evaluated in terms of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). OEs (essential oils) from leaves and flowers showed activity against *M. tuberculosis*, with MIC values of 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 162.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, also showed antiparasitic activity against the promastigote form of *L. amazonensis*, with IC50 values (50% growth inhibition) of 14.36 ± 2.02 (OEs-leaves) and $19.89 \pm 2.66 \mu\text{g} / \text{mL}$ (OEs-flowers). Antiproliferative activity was observed against all human tumor cell lines, with IC50 values significantly lower than those obtained for the normal cell line, demonstrating IC50 values for the MCF-7 line ($367.57 \pm 4.46 \mu\text{g}/\text{mL}$ for OEs leaves and $357.70 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{mL}$ for flower OEs) and M059J. The present study showed the effectiveness of *Spiranthera odoratissima* OE against microorganisms, in combating TB (tuberculosis) and leishmaniasis, the components of its oil showed that it can be used in food, pharmaceutical and agro-industrial industries, being a potential alternative to the use of formulas synthetic.

Key words: Tuberculosis, leishmaniasis, inhibitory properties, medicinal plants, manacá.

INTRODUÇÃO GERAL

1. *Spiranthera odoratissima*

A *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil., é uma espécie da família Rutaceae, amplamente encontrada no cerrado brasileiro e conhecida como manacá, suas folhas são utilizadas pela medicina popular para o tratamento de doenças renais e hepáticas e na depuração sanguínea por terem ação ansiolítica e anti-inflamatória e suas raízes utilizadas para tratar doenças do estômago, dores musculares, dores de cabeça, reumatismo e distúrbios hepáticos, além de depressão do sistema nervoso central (CHAIBUB et al., 2013; SOUZA et al., 2015; GALDINO et al., 2012).

Essa planta possui forma de arbusto com cerca de 1 a 1,5 metros de altura e seus caules são eretos formando touceiras e os ramos tem folhas alternadas, compostas, trifolioladas e pecioladas apresentando glândulas translúcidas e suas flores são brancas possuem aroma muito agradável e suas raízes amareladas e perfumadas, a inflorescência ocorre no ponto mais alto da planta e são encontrados estados de Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia, Distrito Federal e Goiás, mostrada na Figura 1 (ESTRELA, 2016; MATOS et al., 2014; OLIVEIRA, 2016).

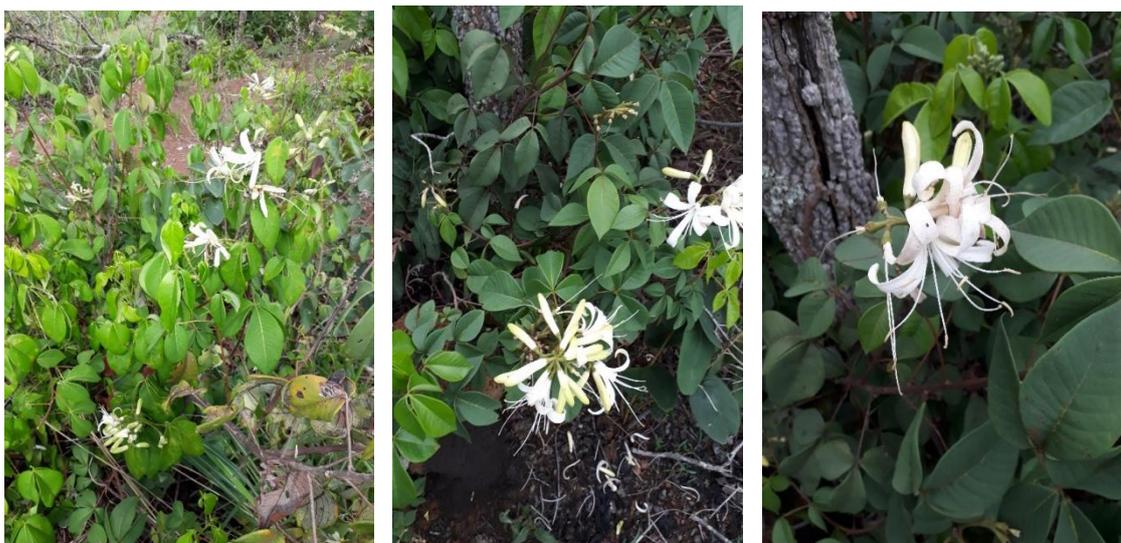


Figura 1. *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil., arbusto com flores e folhas. Fonte: Próprio autor

Plantas da família Rutaceae tem demonstrado propriedades com efeito ansiolítico as quais incluem as espécies *Citrus aurantium* L.; *Casimiroa edulis* La Llave ex Lex. *Ruta chalepensis* L. O óleo essencial obtido destas tem a presença do β -cariofileno composto que é um sesquiterpeno com atividade anti-inflamatória, antiespasmódica, analgésico e neuroprotetor (GALDINO et al., 2012).

Esta família se destaca por serem fortemente aromáticas pela presença de óleos essenciais, também são fonte de alimento como suas frutas cítricas e também utilizadas como plantas ornamentais e outros gêneros como *Citrus*, *Zanthoxylum*, *Ruta*, *Ptelea*, *Murraya* e *Fortunella* vindas de regiões tropicais e temperadas (LOPES et al., 2013).

2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos saturados e insaturados como os terpenos e em sua maioria são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas através da rota do ácido mevalônico mostrado na Figura 2. São compostos voláteis e solúveis em lipídios como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, possuem diferentes atividades biológicas, dentre elas a defesa contra microrganismos, favorecem na polinização, atividade antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antitumorais (ANDRADE et al., 2012; LIMA et al., 2006; RAUT & KARUPPAYIL, 2014; SHARIFI-RAD et al., 2017).

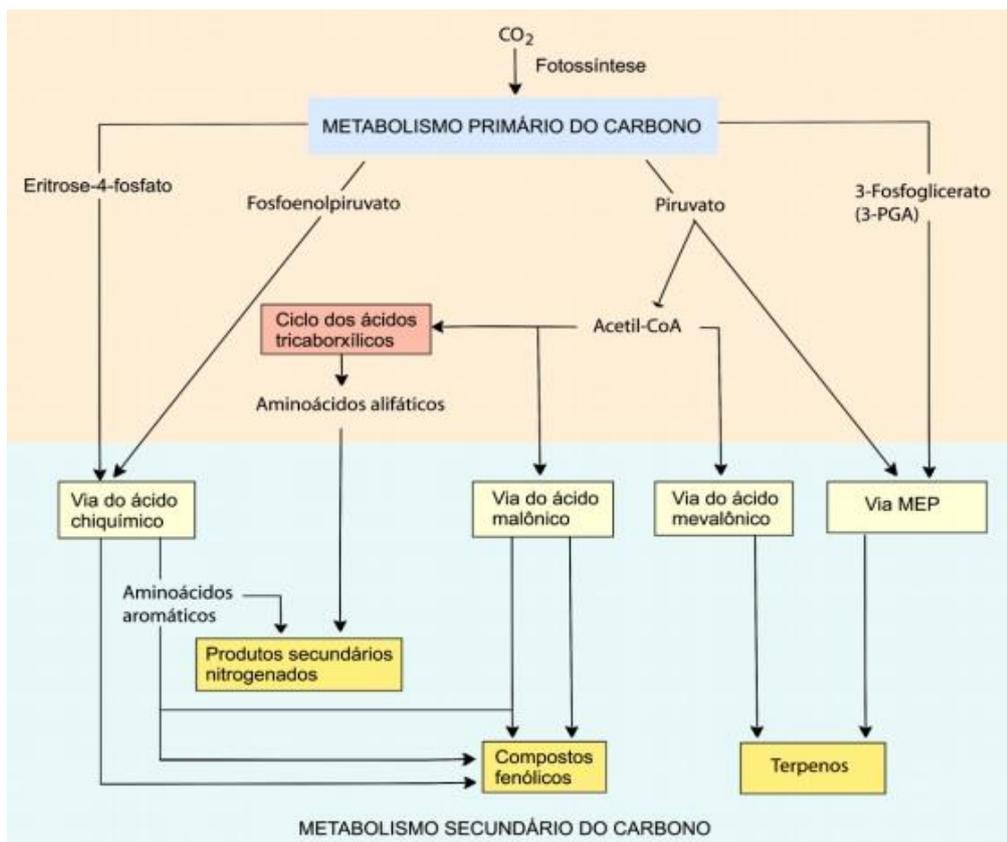


Figura 2. Biossíntese dos terpenos. Fonte: ZEIGER (2006)

O acúmulo e síntese dos óleos essenciais se deve pela presença de estruturas secretoras como tricomas glandulares (Lamiaceae), cavidades secretoras (Myrtaceae, Rutaceae) e ductos de resina (Asteraceae, Apiaceae) (PAVELA & BENELLI, 2016).

Existem 3000 tipos de óleos essenciais catalogados, mas somente 300 deles tem sido empregados no âmbito comercial, dentre eles são empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, no uso farmacêutico e orais, também são comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo com isso, substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al., 2009; DONSI & FERRARI, 2016; MAIA et al., 2015).

Sua composição química pode sofrer variações de acordo com fatores de umidade, condições do solo, temperatura, sazonalidade, técnica de extração, horário de coleta e diferentes estágios de desenvolvimento da planta (MATIAS et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Outra importância dos óleos essenciais é que apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os componentes presentes nos óleos essenciais e porcentagens variam de acordo com a

espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenóides e também os compostos fenólicos (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012).

Estudos realizados por Bahr et al. (2018), demonstraram que o uso do óleo essencial de copaíba para tratamento de artrite nas mãos teve efeito significativo comprovando ainda mais a eficácia do seu uso. Nascimento et al. (2018) em seu trabalho com o óleo essencial das folhas de *Psidium guineense* Sw., observaram o potencial antiproliferativo, salientando que o óleo essencial pode ser promissor em novos tratamentos contra o câncer.

3. Tuberculose

A tuberculose (TB) é a principal doença infecciosa causada por bactérias em todo o mundo, é causada pela microbactéria aeróbica *Mycobacterium tuberculosis* (MT) ou Bacilo de Koch (BK) e pode ser disseminada pela exteriorização de material biológico contaminado, ao espirrar e tossir pulverizando pequenas gotículas. Esta bactéria tem forma de bacilo e aeróbio e álcool-ácido resistente desenvolve-se principalmente nos pulmões, pois esse órgão contém características favoráveis para o desenvolvimento da doença, outra característica importante é que apresenta um longo período de latência em que se inicia a infecção e a fase em que aparecem os sintomas da doença (BERTOLOZZI et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2012).

Os sintomas dessa doença geralmente são percebidos pela presença de tosse crônica, suor noturno, febre, dor no tórax, falta de apetite e indisposição. A tuberculose é responsável pela maioria das mortes anuais, mais do que a AIDS, em países em desenvolvimento e o Brasil ocupa o 13º lugar dentre 22 países com mais casos da doença (SILVA et al., 2018; SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

No Brasil, a região sudeste e norte são as mais afetadas pela doença, o estado de São Paulo é o que apresenta o maior número de casos, acomete várias faixas de idade, principalmente aqueles economicamente ativos, sexo masculino e indígenas pela resistência medicamentosa. Com o aumento nos casos da doença, recentemente iniciou-se uma nova era no tratamento da TB, onde a Organização Mundial da Saúde (OMS) redefiniu uma lista de países acometidos pela tuberculose de acordo com as características epidemiológicas tais como: carga de TB; TB resistente a múltiplos

medicamentos e coinfeção TB e HIV (LEAL et al., 2019; MALACARNE, et al., 2019; MEIRELLES & PALHA, 2019).

4. Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* e no Brasil seu principal vetor é *Lutzomyia longipalpis* transmitida pelas fêmeas do mosquito chamado de flebotomíneos infectados conhecido como mosquito-palha e sua transmissão ocorre de forma promastigota a animais selvagens e domésticos e para o ser humano a infecção ocorre de várias formas: viscerais, cutâneas, mucocutâneas e cutâneas difusas. Essa doença é um problema de saúde pública que ocorre em vários países e no Brasil são encontradas as formas cutâneas e mucocutâneas são desencadeadas por infecções causadas por *L. tropica*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* enquanto a forma visceral que é a mais comum é causada por *L. donovani* e a *L. chagasi*. Ocorre de forma generalizada, crônica, caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, acomete os órgãos como fígado, baço, linfonodos e intestino levando à caquexia e, até mesmo, ao óbito (ALVARENGA et al., 2010; ALVES, 2009; MARCONDES & ROSSI, 2013; OLIVEIRA et al., 2010; PELISSARI et al., 2011; KAUFFMANN et al., 2017).

No continente americano, o Brasil é o país mais acometido pela leishmaniose visceral (LV) sendo esta a segunda doença parasitária mais comum em todo mundo e 11 espécies de *Leishmania* reconhecidas que acometem humanos e 8 em animais. Esta é uma infecção zoonótica de animais silvestres e animais domésticos (MOTA & MIRANDA, 2011).

Vários trabalhos como o de Machado et al. (2016), mostram que o principal propagador da doença é o cão, que é contaminado pelo protozoário e que está relacionada com o aumento da população, taxa de pobreza, baixas condições sanitárias e até adaptação das espécies vetoras sendo estas características propícias para a disseminação da doença entre a população. A Figura 3 mostra o ciclo de transmissão da leishmaniose.

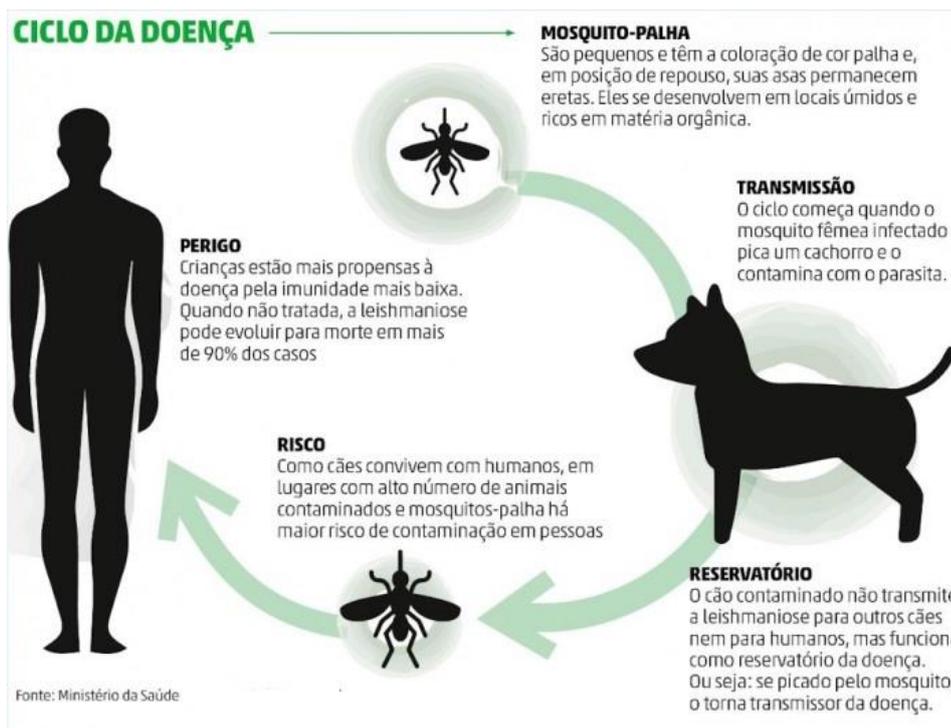


Figura 3. Ciclo de transmissão da *Leishmania amazonensis* na Amazônia brasileira. FONTE: Coelho, 2010.

A leishmaniose é transmitida aos humanos a partir de um hospedeiro, nesse caso Figura 3, o cão. O mosquito vetor da doença contaminado infecta o animal que serve de reservatório para o parasita, uma vez picado novamente pelo mosquito torna-se transmissor da leishmaniose, em seguida, o mosquito contaminado pica o ser humano infectando-o com a doença, no caso as crianças são mais propensas à doença por terem sua imunidade mais baixa com isso, pode evoluir à sua morte.

5. Patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes de alimentos

Dentre os microorganismos deteriorantes de alimentos destacam as bactérias *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* estão entre os mais perigosos patógenos de origem alimentar, causando alto número de doenças e conseqüentemente à morte (Valeriano et al., 2012).

A *Salmonella* sp., é eliminada nas fezes humanas e de animais, por sua vez contaminando o solo e água, sua sobrevivência pode ser longa e conseqüentemente contaminam alimentos não processados como hortaliças, ovos, leite e carne crua. Quando contaminado pela *salmonella*, o quadro clínico em humanos pode variar com

diarreia de características aquosas, fezes consistentes com sangue oculto, ou visível, e muco, esse período regride aproximadamente de três a quatro dias (BRASIL, 2011).

Listeria monocytogenes e *Escherichia coli* também são originadas nos alimentos contaminados, uma vez contaminada por *escherichia coli* a pessoa apresenta quadro clínico de diarreia, febre e vômitos e em casos mais graves pode levar à morte pacientes como recém nascidos e idosos. Quando a contaminação é pela *listeria*, as complicações levam a um quadro denominado de listeriose, os sintomas são comparados aos casos de gripes, dores de cabeça, febre, vômitos, levando a complicações mais graves como a meningite (SIMONETTI, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, D.G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA, A.S.V.; MONREAL, M.T.F.D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.194-197, 2010.

ALVES, W.A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.6 n.71, 2009.

ANDRADE M.A.; CARDOSO M.G.; BATISTA L.R.; MALLET A.C.T.; MACHADO S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v.43, n.2, 2012.

BAHR, T., ALLRED, K., MARTINEZ, D., RODRIGUEZ, D., & WINTERTON, P. "Effects of a massage-like essential oil application procedure using Copaiba and Deep Blue oils in individuals with hand arthritis." **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.33, p.170-176, 2018.

BERTOLOZZI, M.R.; TAKAHASHI, R.F.; HINO, P.; LITVOC, M.; FRANÇA, F.O.S. O controle da tuberculose: um desafio para a saúde pública. **Revista de Medicina**, v.93, n.2, p.83-89, 2014.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas, **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 60p.

CHAIBUB, B.A.; OLIVEIRA, T.B.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, JR. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade

antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.225-229, 2013.

COELHO, L.I.A.R.C. **Caracterização de leishmania spp em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região norte, brasil**. 2010, 94f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) apresentada ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2010.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v.233, p.106-120, 2016.

ESTRELA, F.N. **Atividades antiulcerogênica e antimicrobiana da espécie *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae)**. 2016, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2016.

GALDINO, P.M.; NASCIMENTO, M.V.M.; FLORENTINO, I.F.; LINO, R.C.; FAJEMIROYE, J.O.; CHAIBUB, B.A.; PAULA, J.R.; LIMA, T.C.M.; COSTA, E.A. The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.38, n.2, p.276-284, 2012.

KAUFFMANN, C.; PACHECO, L.A.; BUHL, B.; SCHEIBEL, T.; FREITAS, E.M.; HOEHNE, L.; MACHADO, G.M.C.; CAVALHEIRO, M.M.C.; GNOATTO, S.C.B.; ETHUR, E.M. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de espécies da família Myrtaceae, nativas do sul do brasil. **Revista Destaques Acadêmicos**, v.9, n.3, p.246-258, 2017.

LEAL, B.N.; MESQUITA, C.R.; NOGUEIRA, L.M.V.; RODRIGUES, I.L.A.; OLIVEIRA, L.F.; CALDAS, R.J.C. Análise espacial da tuberculose e da rede de atenção primária à saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.72, n.5, 2019.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LOPES, L.T.A.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; BARA, M.T.F.; SÁ, S.; FERRI, P.H.; FIUZA, T.S. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial e anatomia foliar e caulinar de *Citrus limettioides* Tanaka (Rutaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.4, p.503-511, 2013.

MACHADO, C.J.S.; SILVA, E.G.; VILANI, R.M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde e Sociedade**, v.25, n.1, 2016.

MAIA, T.F.; DONATO, A.; FRAGA, M.E. Atividade antifúngica de oleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.17, n.1, p.105-116, 2015.

MALACARNE, J.; GAVA, C.; ESCOBAR, A.L.; SOUZA-SANTOS, R.; BASTA, P.C. Acesso aos serviços de saúde para o diagnóstico e tratamento da tuberculose entre povos indígenas do estado de Rondônia, Amazônia Brasileira, entre 2009 e 2011: um estudo transversal. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.28, n.3, 2019.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian of Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MATIAS, E. F., ALVES, E. F., SILVA, M. K., CARVALHO, V. R., FIGUEREDO, F. G., FERREIRA, J. V., COUTINHO, H. D. M., SILVA, J. M. F. L., FILHO, J. R & COSTA, J. G. "Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene." **Industrial Crops and Products** 87 (2016): 45-53.

MATOS, L.G.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; REZENDE, M.H.; BARA, M.T.F.; SILVEIRA, E.M.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R. Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.574-584, 2014.

MEIRELLES, R.J.A.; PALHA, P.F. Tratamento diretamente observado para tuberculose no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.72, n.5, 2019.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R.R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivo do Instituto de Otorrinolaringologia**, v.15, n.3, p.376-381, 2011.

NASCIMENTO, K.F.; MOREIRA, F.M.F.; SANTOS, J.A.; KASSUYA, C.A.L.; CRODA, J.H.R.; CARDOSO, C.A.L.; FORMAGIO, A.S.N. "Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol." **Journal of ethnopharmacology**, v.210, p.351-358, 2018.

NOGUEIRA, A.F.; FACCHINETTI, V.; SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.1, n.93, p.3-9, 2012.

OLIVEIRA, D.R. **Avaliação da atividade tipo antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. e de seu componente majoritário, β -cariofileno**. 2016, 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, A.C.; DORVAL, M.E.C.; ALVES, T.P.; FERNANDES, T.D.; OSHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.L.L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.188-193, 2010.

- PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. **Trends in Plant Science**, v.21, n.12, p.1000-1007, 2016.
- PELISSARI, D.M.; BARTHOLOMAY, P.; JACOBS, M.G. Arakaki-Sanchez, D.; ANJOS, D.S.O.; COSTA, M.L.S.; CAVALCANTI, P.C.S.; Diaz-Quijano, F.A. Offer of primary care services and detection of tuberculosis incidence in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.52, n.53, p.1-10, 2018.
- RAUT, J.S. KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250–264, 2014.
- SHARIFI-RAD, J.; SALEHI, B.; VARONI, E.M.; SHAROPOV, F.; YOUSAF, Z.; AYATOLLAHI, S.A.; KOBARFARD, F.; SHARIFI-RAD, M.; AFDJEI, M.H.; SHARIFI-RAD, M.; IRITI, M. Plants of the Melaleuca Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. **Phytotherapy Research**, v.31, n.10, p.1475-1494, 2017.
- SILVA, M.E.N.; LIMA, D.S.; SANTOS, J.E.; MONTEIRO, A.C.F.; TORQUATO, C.M.M.; FREIRE, V.A.; RIBEIRO, D.B.C.; FEITOSA, A.C.S.; TEIXEIRA, A.B. General aspects of tuberculosis: an update on the etiologic agent and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.51, n.4, 2018.
- SIMONETTI, E. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia Anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes***. 2015. 101f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2015.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.23, n.2, p.136-141, 2012.
- SOUSA, D.P.; HOCAYEN, P.A.S.; ANDRADE, L.N.; ANDREATINI, R. A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. **Molecules**, v.20, n.10, p.18620-18660, 2015.
- SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v.28, n.4, p.678-682, 2005.
- SOUZA, S.J.; FERRI, P.H.; FIUZA, T.S.; BORGES, L.L.; PAULA, J.R. Composição química e variabilidade sazonal das folhas de óleos voláteis de *Spiranthera odoratissima*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.28, n.1, 2018.
- VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem familiar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.
- ZEIGER, E. Secondary metabolites and Plant defense. In: *Plant Physiology*. 4^o Ed., Sinauer Associates, 2006, cap 13.

OBJETIVOS

Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais presentes nas folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil.

Verificar o potencial do óleo essencial da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae) como agente antibacteriano.

Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de *S. odoratissima* A. St. Hil., contra bactérias deteriorantes de alimentos.

Determinar a bioatividade de óleos essenciais de folhas e flores de *S. odoratissima* contra patógenos causadores de doenças como a tuberculose e a leishmaniose.

CAPÍTULO I - Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais Extraídos de Folhas e Flores de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae)

(Normas de acordo com a revista Records of Natural Products, 2019)

Resumo: *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae), ou manacá, uma planta cultivada no Centro-Oeste brasileiro, vem sendo usada para o tratamento de reumatismo, infecção e dores abdominais. Esta pesquisa tem por objetivo investigar os constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação e totalmente caracterizadas por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os resultados do óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* A. St. Hil. mostraram conter 28 componentes voláteis que representam 93,8% do óleo. Seus componentes principais foram β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%), δ -cadineno (7,1%), germacreno D (5,9%), α -copaeno (5,5%) e β -elemeno (5,3%). Os resultados do óleo essencial das flores de *S. odoratissima* A. St. Hil. mostraram conter 29 componentes voláteis que representam 94,4% do óleo. Seus principais constituintes foram β -cariofileno (14,1%), espatulenol (8,1%), γ -cadineno (7,2%), α -cadinol (6,6%), α -copaeno (6,4%), τ -muurolol (6,3%), δ -cadineno (5,8%), β -elemeno (5,4%) e aloaromadrendano (5,2%). Nesta pesquisa, investigou-se pela primeira vez os constituintes químicos do óleo essencial das flores de *S. odoratissima* A. St. Hil.

Palavras-chave: *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil.; Rutaceae; óleos essenciais; β -cariofileno; planta medicinal.

1. Introdução

1.1. Fonte vegetal

As folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil., foram coletadas em novembro de 2017 no município de Iporá, Goiás nas coordenadas (16°24'11,2''Sul e 51°06'41,4''Oeste). A planta foi identificada pela botânica MSc. Erika Amaral, e uma exsicata (n° 1039) foi depositada no herbário do Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde.

1.2. Estudos Prévios

O gênero *Spiranthera* (Rutaceae) compreende três espécies distribuídas pela América do Sul, principalmente no Brasil, Bolívia, Guiana e Venezuela. No que diz respeito à sua composição química, a espécie *S. odoratissima* contém alcaloides da furoquinolina e β -indoloquinazolina, cumarina, terpeno, esteroide e limonoides. A *S. odoratissima* A. St. Hillaire, que é um arbusto encontrado no cerrado brasileiro, é conhecida no Brasil como manacá. Na medicina popular, suas folhas e raízes têm sido amplamente usadas no tratamento de várias doenças, como sífilis, reumatismo, infecção renal, retenção urinária, dor abdominal, gota, furúnculos e acne. As atividades anti-inflamatórias, analgésicas, ansiolíticas e antiprotozoárias dos óleos essenciais da *S. odoratissima* A. St. Hil., foram registradas na literatura.

Nesta pesquisa, foram identificados os constituintes químicos dos óleos das folhas e flores da *S. odoratissima* A. St. Hil., coletada em Iporá, GO. Esta é a primeira vez em que se conduz uma análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais das flores de *S. odoratissima* A. St. Hil.

2. Material e Método

2.1. Presente Estudo

Folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil., foram sujeitas a duas horas de hidrodestilação por um aparelho do tipo Clevenger. Para executar a análise, dividiu-se 300 g de material vegetal em três amostras de 100 g e acrescentou-se 500 mL de água destilada a cada amostra. Após a coleta manual das amostras de óleos essenciais, os traços restantes de água nos óleos foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. O procedimento de extração foi feito em triplicata. O óleo isolado foi armazenado sob refrigeração até análise. Os rendimentos (m/m) foram calculados a partir do peso de folha e flor frescas e expressos como a média da análise em triplicata.

As análises por cromatografia gasosa (GC) foram realizadas por um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 Plus equipado com um amostrador automático AOC-20s, um detector por ionização de chama (FID) e um processador de tratamento de dados. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm d.i.; espessura de filme de 0,25 μm). As condições de operação foram as seguintes: a temperatura da coluna programada para aumentar de 60 a 240 °C a 3 °C/min e depois manter a 240 °C por 5 min; gás portador = He (99,999%), a 1,0 mL/min; modo de injeção; volume de injeção, 0,1 μL (proporção de divisão de 1:10); e temperaturas do injetor e detector = 240 e 280 °C, respectivamente. As concentrações relativas de componentes foram obtidas pela normalização da área de pico (%). As áreas relativas foram a média das análises GC-FID em triplicado.

As análises de GC-MS foram realizadas por um sistema Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i. A coluna foi um capilar de sílica fundida RTX-5MS (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm de espessura de filme). O modo de ionização eletrônica ocorreu a 70 eV. O hélio (99,999%) foi empregado como gás transportador a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 0,1 μL (proporção de divisão de 1:10). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram fixadas em 240 e 280 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno era o mesmo utilizado para o GC. Os espectros de massa foram obtidos em um intervalo de varredura de 0,5 s, na faixa de massa de 40 a 600 Da. A identificação de componentes voláteis das folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil. (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar RTX-5MS nas mesmas condições de operação encontradas no caso do GC, relacionada a uma série homóloga de n-alcanos (C₈-C₂₀). As estruturas foram comparadas por computador com as bibliotecas de espectros Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura.

3. Resultados e Discussão

Tabela 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima* A. St. Hil.

Componentes	IR _{exp}	IR _{lit}	% AR	
			Folhas	Flores
Limoneno	1030	1031	0,5	0,5
Linalol	1101	1098	-	1,0
terpineno-4-ol	1171	1177	-	0,3
α -terpineol	1190	1192	-	0,4
Bicicloelemeno	1327	1331	1,3	0,3
α -cubebeno	1358	1352	2,3	2,1
α -copaeno	1365	1372	5,5	6,4
β -elemeno	1389	1392	5,3	5,4
β -cariofileno	1416	1418	23,8	14,1
α -bergamoteno	1430	1436	0,6	1,6
α -humuleno	1447	1455	4,8	3,9
Aloaromadendreno	1455	1461	2,6	5,2
γ -muuroleno	1472	1477	1,1	1,9
germacreno D	1478	1480	5,9	3,3
β -selineno	1482	1485	1,5	0,9
Biciclogermacreno	1490	1496	10,8	4,2
α -muuroleno	1494	1499	-	2,7
germacreno A	1501	1503	0,4	0,4
γ -cadineno	1510	1513	3,0	7,2
δ -cadineno	1521	1524	7,1	5,8
α -cadineno	1533	1538	0,3	0,7
germacreno B	1554	1561	0,5	-
Espatulol	1581	1578	2,9	8,1
óxido de cariofileno	1585	1583	1,6	3,0
Viridiflorol	1591	1595	1,2	0,7
Epiglobulol	1601	1598	-	0,4
Carotol	1613	1597	0,3	-
humulano-1,6-dieno-3-ol	1618	1619	0,3	-
epóxido de isoaromadendreno	1623	1622	0,5	0,4
τ -muurolol	1643	1640	4,3	6,3
δ -cadinol	1647	1645	0,5	0,6
α -cadinol	1658	1653	4,7	6,6
Nootkatone	1810	1807	0,2	-
Hidrocarbonetos monoterpênicos			0,5	0,5
Monoterpênicos oxigenados			-	1,7
Hidrocarbonetos de sesquiterpênicos			76,6	66,1
Sesquiterpênicos oxigenados			16,7	26,1
Total			93,8	94,4

IR_{exp}: Índice de retenção relativo a n-alcenos (C8-C20) na coluna Rtx-5MS; IR_{lit}: Índice de retenção encontrado na literatura; AR%: área relativa.

Vinte e oito componentes foram identificados no óleo das folhas de *S. odoratissima* A. St. Hil., que exibiam cerca de 93,8% da composição total do óleo, enquanto vinte e nove componentes foram identificados em óleos de suas flores, que apresentaram cerca de 94,4% da composição total do óleo. Os principais constituintes dos óleos essenciais de suas flores foram β -cariofileno (14,1%), espatulol (8,1%), γ -cadineno (7,2%), α -cadinol (6,6%), α -copaeno (6,4%), τ -muurolol (6,3%), δ -cadineno

(5,8%), β -elemeno (5,4%) e aloaromadendreno (5,2%). Os principais constituintes dos óleos essenciais de suas folhas foram β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%), δ -cadineno (7,1%), germacreno D (5,9%), α -copaeno (5,5%) e β -elemeno (5,3%). A composição química dos óleos essenciais de *S. odoratissima* A. St. Hil. folhas foi semelhante à descrita anteriormente na literatura. Esta pesquisa sobre óleos essenciais de *S. odoratissima* A. St. Hil. adiciona informações quimiotaxonômicas relevantes à literatura, uma vez que há relatos de isolamento de furoquinolina e alcaloides da β -indoloquinazolina, cumarina, terpeno, esteróide e limonóides dessa espécie. Constituintes químicos dos óleos de *S. odoratissima* A. St. Hil. estão descritos na Tabela 1. O segundo passo será avaliar as atividades biológicas desses óleos essenciais, a fim de valorizar esta espécie com um caráter ecológico especial.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à FAPEG, CNPq, IFGOIANO – Campus Rio Verde e CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] J. R. Pirani (2010). *Spiranthera atlantica* (Rutaceae, Galipeae), a new species and the first record of the genus for the Brazilian Atlantic Forest, *Novon*, **20(2)**, 203-206.
- [2] A. P. Terezan, R. A. Rossi, R. N. A. Almeida, T. G. Freitas, J. B. Fernandes, M. F. G. F. Silva, P. C. Vieira, O. C. Bueno, F. C. Pagnocca, and J. R. Pirani (2010). Activities of extract and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus, *J. Braz. Chem. Soc.* **21(5)**, 882-886.
- [3] L. G. Matos, I. S. Pontes, L. M. F. Tresvenzol, J. R. Paula, and E. A. Costa (2004). Analgesic and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (Manacá) roots, *Phytother. Res.* **18(12)**, 963-966.
- [4] S. J. O. Souza, P. H. Ferri, T. S. Fiuza, L. L. Borges, and J. R. Paula (2018). Chemical composition and seasonality variability of the *Spiranthera odoratissima* volatile oils leaves, *Braz. J. Pharmacog.* **28(1)**, 16-20.
- [5] R.P. Adams (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured publishing Co. Carol Stream, Illinois.

- [6] B. A. Chaibub, T. B. Oliveira, T. S. Fiuza, M. T. F. Bara, L. M. F. Tresvenzol, J. R. Paula (2013). Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil., *Rev. Bras. Pl. Med.* **15(2)**, 225-229.

CAPÍTULO II - Atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. contra patógenos de origem alimentar e bactérias deteriorantes de alimentos

(Normas de acordo com a revista Australian Journal of Crop Science, 2019)

RESUMO

Na medicina popular brasileira, a *Spiranthera odoratissima* é usada no tratamento de reumatismo, infecção e dor abdominal. Os óleos essenciais (OEs) são opções tecnológicas que podem ser empregadas em alimentos naturais devido às suas atividades antimicrobianas. Este trabalho teve como objetivo investigar a composição química e os efeitos antibacterianos *in vitro* dos OEs obtidos de folhas e flores de *S. odoratissima* contra bactérias de origem alimentar e deteriorantes, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos OEs foram calculados usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. As análises GC-FID e GC-MS revelaram que os principais componentes determinados no óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* foram β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%) e δ -cadineno (7,1%). Os principais constituintes do óleo das flores foram β -cariofileno (14,1%), espatulenol (8,1%) e γ -cadineno (7,2%). Os OEs de *S. odoratissima* apresentaram a maior atividade antibacteriana contra *Yersinia enterocolitica* (CIM = 0,30 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM = 0,12 mg/mL) e *Listeria monocytogenes* (CIM = 0,25 mg/mL). Esses OEs podem ser uma alternativa natural importante para impedir o crescimento bacteriano em produtos alimentícios.

Palavras-chave: Alimentos, manacá, bactérias.

INTRODUÇÃO

Embora as propriedades biológicas dos óleos essenciais (OE) extraídos de plantas aromáticas e medicinais são explorados por muitos anos, o uso de antimicrobianos naturais recentemente ganhou mais atenção com o objetivo de preservação de alimentos (Barbosa et al., 2015). Patógenos de origem alimentar, amplamente distribuídos na natureza, têm sido a principal causa de problemas de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Como esses agentes são responsáveis por considerável mortalidade, eles aumentam os custos dos cuidados de saúde e a perda de produtividade e controle na indústria de alimentos. *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* estão entre os mais perigosos patógenos de origem alimentar, porque causam a maior número de doenças e mortes (Valeriano et al., 2012).

Sabe-se que os maiores desafios enfrentados pelo uso agentes antimicrobianos nos alimentos são barreiras da regularização, mesmo que vários componentes de OE tenham sido registrados para serem usados como intensificadores de sabor em alguns países, como os EUA. O uso de aromatizadores naturais em alimentos é permitido no Brasil, esses compostos não precisam ser registrados no Ministério da Saúde, que considera que eles não representam nenhum risco para a saúde dos consumidores, carvacrol, carvona, cinamaldeído, citral, eugenol, mentol, timol, p-cimeno e limoneno são alguns deles. No entanto, outros compostos, como metil eugenol e estragol, foram considerados tóxicos e não devem ser adicionados aos alimentos (Santos et al., 2011).

Para mitigar doenças e perdas econômicas causadas por microrganismos patogênicos, o uso de produtos naturais, como compostos antimicrobianos, parece ser relevante para controlar bactérias patogênicas e prolongar a vida útil de alimentos processados, principalmente quando há prevalência de microrganismos resistentes aos convencionais anti-sépticos e antibióticos, além de aumento da popularidade conceitos de qualidade dos alimentos e o impacto negativo de 334 aditivos sintéticos para a saúde. Assim, o aumento dos consumidores pela demanda por produtos naturais eficazes e seguros desencadeou investigações sobre os efeitos dos fitoquímicos, como resultado, o número de estudos sobre OEs aumentou consideravelmente (Valeriano et al., 2012).

EOs são novas opções tecnológicas que podem ser empregadas como conservantes. Como eles têm uma atividade de amplo espectro contra bactérias, vírus, fungos, parasitas e insetos, eles potencialmente podem ser aplicado a produtos farmacêuticos, sanitários, indústrias cosmética, agrícola e alimentícia. Devido à sua

extração, geralmente por destilação por arraste a vapor, eles contêm uma variedade de moléculas voláteis, como terpenos, terpenóides, compostos aromáticos derivados de fenol e componentes alifáticos (Franciscato et al., 2018).

Estudos de atividade antibacteriana de OE contra patógenos transmitidos por alimentos foram realizados, principalmente *in vitro* e aplicando bactérias e OE aos produtos alimentares simultaneamente (Valeriano et al., 2012).

É importante enfatizar que os alimentos devem ser livres de patógenos e protegidos contra a deterioração microbiana durante a vida de prateleira. Como a demanda dos consumidores por produtos naturais e seguros sem conservantes químicos aumentou, pesquisas sobre a avaliação de técnicas alternativas que visam preservar sua qualidade microbiológica e mantendo suas as propriedades nutricionais e sensoriais estão aumentando (ElSalam e Ibrahim, 2014).

Spiranthera odoratissima (Rutaceae), popularmente conhecida como manacá, é um arbusto encontrado na savana e floresta em Brasil central e Bolívia. Na medicina popular, tem sido usada no tratamento de reumatismo, gota, infecções renais, retenção urinária, dores abdominais e acne, anti-inflamatório, analgésico, ansiolítico e antiprotozoário, as atividades de OE de *S. odoratissima* foram relatadas por a literatura (Souza et al., 2018). No entanto, o melhor de nosso conhecimento, a atividade antibacteriana dos OE das flores de *S. odoratissima* ainda não foi documentado.

Para continuar os estudos com OE de *S. odoratissima* (Cabral et al., 2019) tiveram como objetivo realizar uma investigação pioneira sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* OE de folhas e flores de *S. odoratissima* (Figura 1) contra as seguintes bactérias de origem alimentar e deterioradas: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal e Extração dos Óleos Essenciais

Folhas e flores de *Spiranthera odoratissima* foram coletadas no mês de novembro no ano de 2017 às 08:30 da manhã na cidade de Iporá, estado de Goiás seguindo as seguintes coordenadas: (16°24'11,2''Sul e 51°06'41,4''Oeste). A planta foi identificada pela botânica MSc. Erika Amaral, e uma exsicata (n° 1039) foi depositada

no herbário de Rio Verde, no Instituto Federal Goiano (IFGOIANO). Os óleos essenciais de *S. odoratissima* foram extraídos de folhas e flores por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 2 h. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. O material vegetal foi dividido em três amostras de 500 g cada, e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual dos óleos essenciais, os traços de água remanescentes no óleo foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. Os OEs foram armazenados em uma garrafa de cor âmbar e mantidos em geladeira a 4 °C até a análise. O rendimento de OEs foi calculado a partir do peso das folhas e flores e expresso como a média das análises em triplicata.

Análise dos Óleos Essenciais

Os OEs foram dissolvidos em éter etílico e analisados por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) usando os sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna no GC-FID foi programada para subir de 60 para 240 °C a 3 °C/min e foi mantida a 240 °C por 5 min; o gás transportador era H₂ a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µL (proporção de divisão de 1:10) e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280 °C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas normalizando as áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média das análises GC-FID em triplicata. As condições do GC-MS e a identificação dos óleos essenciais foram previamente relatadas (Melo et al., 2015). A identificação dos componentes voláteis dos óleos essenciais de *S. odoratissima* foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m X 0,25 mm; 0,250 µm) nas mesmas condições operacionais usadas para GC em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₀). As estruturas foram comparadas por computador com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

Atividade antibacteriana

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada usando microplacas de 96 poços, conforme recomendado pelo NCCLS (2003). Para a preparação das placas, 500 mg de óleos essenciais foram solubilizados em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e

submetidos a diluições em série 1:2 para outros 8 tubos. Em seguida, cada tubo foi adicionado com 19 mL de ágar Muller-Hinton a 50 °C. Os tubos foram submetidos a vórtice e seu conteúdo foi derramado em placas de Petri para dar concentrações variando na proporção de 12,50 mg/mL a 0,098 mg/mL para os óleos essenciais. Placas contendo DMSO e apenas o meio de cultura, preparado sob as mesmas condições, foram utilizadas como controle. As suspensões dos microrganismos foram preparadas em solução salina estéril a 0,9% e a turbidez foi ajustada para uma turbidez equivalente à metade da escala 1.0 McFarland (NCCLS, 2003). Os inóculos bacterianos foram aplicados às placas com o auxílio do inoculador Steers e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas (Steers et al., 1959). A CIM foi considerada a menor concentração de óleo essencial a inibir o desenvolvimento de bactérias. O experimento foi realizado em duplicado.

RESULTADOS

Composição Química dos Óleos Essenciais Extraídos

Foram obtidos os óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *S. odoratissima*, com rendimento de 2,5% e 3,0% (m/m), respectivamente. Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa com detector por ionização por (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Conforme listado na Tabela 1, os principais componentes dos óleos essenciais foram os hidrocarbonetos de sesquiterpeno, seguidos pelos sesquiterpenos oxigenados. Os três componentes principais identificados no óleo essencial das folhas são β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%) e δ -cadineno (7,1%). Os principais componentes do óleo essencial das flores são o β -cariofileno (14,1%), o espatulenol (8,1%) e o γ -cadineno (7,2%). Vinte e oito componentes foram identificados em óleos de folhas de *S. odoratissima*, que exibiram cerca de 93,8% da composição total do óleo, enquanto que vinte e nove componentes foram identificados no óleos das flores, que apresentaram cerca de 94,4% da composição total do óleo (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima*

Componentes	IR _{exp}	IR _{lit}	% AR	
			Folhas	Flores
Limoneno	1030	1031	0,5	0,5
Linalol	1101	1098	-	1,0
terpineno-4-ol	1171	1177	-	0,3
α -terpineol	1190	1192	-	0,4
Bicicloelemeno	1327	1331	1,3	0,3
α -cubebeno	1358	1352	2,3	2,1
α -copaeno	1365	1372	5,5	6,4
β -elemeno	1389	1392	5,3	5,4
β -cariofileno	1416	1418	23,8	14,1
α -bergamoteno	1430	1436	0,6	1,6
α -humuleno	1447	1455	4,8	3,9
Aloaromadendreno	1455	1461	2,6	5,2
γ -muuroleno	1472	1477	1,1	1,9
germacreno D	1478	1480	5,9	3,3
β -selineno	1482	1485	1,5	0,9
Biciclogermacreno	1490	1496	10,8	4,2
α -muuroleno	1494	1499	-	2,7
germacreno A	1501	1503	0,4	0,4
γ -cadineno	1510	1513	3,0	7,2
δ -cadineno	1521	1524	7,1	5,8
α -cadineno	1533	1538	0,3	0,7
germacreno B	1554	1561	0,5	-
Espatulenol	1581	1578	2,9	8,1
óxido de cariofileno	1585	1583	1,6	3,0
Viridiflorol	1591	1595	1,2	0,7
Epiglobulol	1601	1598	-	0,4
Carotol	1613	1597	0,3	-
humulano-1,6-dieno-3-ol	1618	1619	0,3	-
epóxido de isoaromadendreno	1623	1622	0,5	0,4
τ -muurolol	1643	1640	4,3	6,3
δ -cadinol	1647	1645	0,5	0,6
α -cadinol	1658	1653	4,7	6,6
Nootkatone	1810	1807	0,2	-
Hidrocarbonetos monoterpênicos			0,5	0,5
Monoterpenos oxigenados			-	1,7
Hidrocarbonetos de sesquiterpenos			76,6	66,1
Sesquiterpenos oxigenados			16,7	26,1
Total			93,8	94,4

IR_{exp}: Índice de retenção relativo a *n*-alcanos (C₈-C₂₀) na coluna Rtx-5MS; IR_{lit}: Índice de retenção encontrado na literatura. AR%: área relativa.

Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais Extraídos

A atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *S. odoratissima* contra os microrganismos testados e suas atividades potenciais na saúde foram avaliadas quantitativamente pelos valores da CIM. Os dados obtidos a partir dos valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos OEs foram calculados usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. Os resultados da CIM são apresentados na Tabela 2. Os dados indicaram que os óleos essenciais exibiam níveis variáveis de atividade antibacteriana contra os microrganismos investigados. As propriedades inibidoras dos óleos essenciais foram observadas dentro de uma faixa de concentrações de 1,0 a 0,12 mg/mL. Observou-se atividade máxima contra *Listeria monocytogenes* (CIM = 0,25 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM = 0,12 mg/mL) e *Yersinia enterocolitica* (CIM = 0,30 mg/mL). Valores mais altos de CIM foram obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 0,60 mg/mL), *Escherichia coli* (CIM = 1,0 mg/mL) e *Salmonella enteritidis* (CIM = 0,70 mg/mL).

Tabela 2. Valores de concentração mínima inibitória (mg/mL) dos óleos essenciais das folhas e flores de *S. odoratissima*.

Bacteria	Flores	Folhas
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,70	0,70
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,30	0,30
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,12	0,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,60	0,60
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25	0,25
<i>Escherichia coli</i>	1,00	1,00

DISCUSSÃO

O óleo essencial obtido das folhas de *S. odoratissima* apresentou alta concentração de hidrocarbonetos sesquiterpenos, principalmente: β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%) e δ -cadineno (7,1%), perfazendo 41,7% da composição total do óleo. Também foram encontrados como compostos principais nos óleos essenciais de outras espécies da família Rutaceae, como *Haplophyllum linifolium* (biciclogermacreno e β -cariofileno) e *Pilocarpus spicatus* (δ -cadineno) (Iñigo et al., 2002; Andrade-Neto et al., 2002). O β -cariofileno também foi identificado como um componente importante nos óleos essenciais de *Galeopsis bifida* (22%), *Vernonia remotiflora* (42,2%),

Vernonia brasiliensis (36,7%), *Annona foetida* (14,19%) (Olennikov et al., 2010; Maia et al., 2010; Costa et al., 2009). Enquanto o biciclogermacreno foi identificado como o principal componente do óleo essencial de *Annona foetida* (35,12%) (Santos et al., 2016).

A atividade antibacteriana *in vitro* dos OEs de *S. odoratissima* contra os microrganismos estudados e suas atividades potenciais foram avaliadas quantitativamente por valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os dados obtidos a partir dos valores de CIM dos EOs foram calculados pelo método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. Os resultados da CIM são mostrados na Tabela 2. Os dados indicaram que os OEs exibiram níveis variáveis de atividade antibacteriana contra os microrganismos investigados. As propriedades inibitórias dos OE foram observadas dentro de uma faixa de concentração de 1,0 a 0,12 mg/mL. Observou-se atividade máxima contra *Listeria monocytogenes* (MIC = 0,25 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (MIC = 0,12 mg/mL), *Yersinia enterocolitica* (MIC = 0,30 mg/mL), *Clostridium botulinum* (MIC = 0,30 mg/mL) e *Bacillus cereus* (MIC = 0,20 mg/mL). Valores mais altos de CIM foram obtidos contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 0,60 mg/mL), *Escherichia coli* (CIM = 1,0 mg/mL), *Salmonella enteritidis* (CIM = 0,70 mg/mL) e *Salmonella typhimurium* (CIM = 0,70 mg/mL). Cabe ressaltar que a metodologia utilizada neste estudo é a publicada anteriormente por Chaibub et al., (2013). No entanto, alguns valores de CIM encontrados para as mesmas cepas bacterianas neste estudo foram muito diferentes dos descritos anteriormente.

De acordo com Aligiannis et al. (2001), usando o método de diluição em caldo, é relatado que amostras testadas com valores de CIM $\leq 0,5$ mg/mL apresentaram forte inibição antimicrobiana, CIM de 0,6 mg/mL a 1,5 mg/mL, a inibição foi considerada moderada e CIM $> 1,6$ mg/mL, uma inibição fraca. Considerando esses parâmetros, verificou-se que os óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *S. odoratissima* apresentaram forte inibição contra *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e atividade moderada contra as demais bactérias avaliadas.

A *Yersinia enterocolitica* é uma bactéria enteropatogênica responsável pela gastroenterite humana. A yersiniose entérica é uma doença de origem alimentar, transmitida pela via fecal-oral. A apresentação clínica da yersiniose inclui diarreia, dor abdominal, febre e, às vezes, vômitos (Rahman et al., 2011). A *Listeria monocytogenes* é um patógeno bacteriano que causa uma doença potencialmente grave em humanos e animais, chamada listeriose. Em todo o mundo, estima-se que a maioria dos casos

humanos ocorra após o consumo de alimentos contaminados. Os alimentos implicados com mais frequência, tanto em surtos quanto em casos esporádicos, são queijos macios, salsichas, leite não pasteurizado, carnes, peixe defumado, laticínios, saladas e produtos refrigerados prontos para consumo (Buchanan et al., 2017). O *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de diversas infecções em humanos, incluindo gastroenterite. A intoxicação alimentar por estafilococos ocorre devido à ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos, e seus sintomas incluem vômitos, diarreia e câibras. Essa é uma das doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes no mundo (Dittmann et al., 2017). Com base nos problemas causados pelas bactérias mencionadas, a aplicação de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais e seus componentes reforçou as atividades antimicrobianas, antioxidantes e conservantes de alimentos contra uma ampla gama de patógenos microbianos (Pellegrini et al., 2018).

EOs de *S. odoratissima* também apresentaram alto potencial inibitório contra duas bactérias causadoras de contaminação alimentar: *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*, esta última é uma bactéria Gram-positiva, facultativamente anaeróbica, que forma esporos e é amplamente distribuída no ambiente devido à sua capacidade de sobreviver em condições hostis. Pesquisadores em todo o mundo o descreveram como contaminante de alimentos, uma vez que podem ser encontrados em diferentes tipos de alimentos crus, como arroz, carne, vegetais, leite e laticínios, além de alimentos cozidos. *B. Cereus* nos alimentos geralmente está associado à deterioração e intoxicação alimentar, que levam a síndromes eméticas e diarréicas (Organji et al., 2015). O botulismo é uma doença que resulta da atividade de uma potente neurotoxina derivada de proteína produzida por *Clostridium botulinum*, geralmente como resultado da ingestão de alimentos nos quais a bactéria produziu a toxina. Quatro tipos de doenças humanas são causadas pela toxina: transmitida por alimentos, feridas, colonização intestinal de adultos e bebês. O botulismo transmitido por alimentos resulta da ingestão de toxinas pré-formadas, enquanto os outros três tipos ocorrem por infecção, multiplicação e produção de toxinas por microrganismos clostridiais em feridas ou no trato gastrointestinal (Peck e Vliet, 2016).

Alguns constituintes químicos identificados nos óleos essenciais de *S. odoratissima* têm reconhecida atividade antibacteriana relatada na literatura (Pandey et al., 2017). Por exemplo, verificou-se que o β -cariofileno e o biciclogermacreno são altamente concentrados em óleos essenciais de espécies de Verbenaceae, exibindo

atividade antimicrobiana promissora (Montanari et al., 2011). Além disso, a atividade antibacteriana de componentes individuais de OEs, como α -humuleno, espatulenol e β -cariofileno, foi relatada anteriormente (Rahman et al., 2016). Como nos OEs de *S. odoratissima*, o γ -cadineno foi um dos principais constituintes do óleo essencial, assim como este mesmo composto foi um dos principais constituintes do óleo essencial de *Xenophyllum poposum* que também exibiu atividade antibacteriana pronunciada contra duas cepas de *Staphylococcus aureus* (González et al., 2012).

Presume-se que os compostos não polares difundam facilmente através das membranas celulares, afetando as vias metabólicas ou as organelas bacterianas. Além disso, esses compostos podem interagir com a membrana bacteriana e induzir mudanças fisiológicas drásticas, causando perda de permeabilidade da membrana, que acabam levando à morte celular (Raut e Karuppaiyil, 2014).

A atividade antimicrobiana de um determinado óleo essencial pode depender apenas de um ou dois dos principais constituintes que compõem o óleo essencial. De acordo com o crescente nível de evidência, a proporção em que os principais constituintes ativos estão presentes pode não ser o único fator responsável pela atividade inerente aos óleos essenciais, mas as interações entre esses e os constituintes de menor porcentagem nos óleos também são importantes. Em suma, possíveis interações sinérgicas entre os componentes dos óleos essenciais são benéficas por sua atividade contra patógenos de transmissão alimentar e bactérias deteriorantes dos alimentos (Baldim et al., 2018).

CONCLUSÃO

O trabalho mostrou que o óleo essencial de *S. odoratissima*, além de apresentar altos teores, apresentou alta atividade antibacteriana *in vitro* contra *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Os óleos essenciais de folhas e flores de *S. odoratissima* mostraram-se moderadamente ativos contra *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à FAPEG, CNPq, IFGOIANO – Campus Rio Verde e CAPES pelo auxílio financeiro. Ao biólogo Wendel C. Sousa pela ajuda na coleta do material vegetal e à estudante Hellen R. F. Batista pela colaboração na extração dos óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation.
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J Agric Food Chem. 49(9): 4168-4170.
- Andrade-Neto M, Cunha UA, Mafezoli J, Silveira ER (2002) Volatile constituents of different populations of *Pilocarpus spicatus* Saint Hill. (Rutaceae) from the Northeast of Brazil. J Essent Oil Res. 14(1), 319-324.
- Baldim JL, Silveira JGF, Almeida AP, Carvalho PLN, Rosa W, Schripsema J, Chagas-Paula DA, Soares MG, Luiz JHH (2018) The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. Ind Crops Prod. 112(1): 821-829.
- Barbosa LN, Probst IS, Andrade BFMT, Alves FCB, Albano M, Rall VLM, Júnior AF (2015) Essential oils from herbs against foodborne pathogens in chicken sausage. J Oleo Sci. 64(1): 117-124.
- Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC (2017) A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control. 75(1): 1-13.
- Cabral FD, Alves CCF, Cabral RSC, Willrich GB, Crotti AEM, Miranda MLD (2019) Chemical constituents of essential oils extracted from the leaves and flowers of *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae). Rec Nat Prod. 13(2): 172-175.
- Costa EV, Pinheiro MLB, Silva JRA, Maia BHLNS, Duarte MCT, Amaral ACF, Machado GMC, Leon LL (2009) Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). Quim Nova 32(1): 78-81.
- Chaibub BA, Oliveira TB, Fiuza TS, Bara MTF, Tresvenzol LMF, Paula JR (2013) Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. Rev. Bras. Pl. Med. 15(2): 225-229.
- Dittmann KK, Chaul LT, Lee SHI, Corassin CH, Oliveira CAF, Martinis ECP, Alves VF, Gram L, Oxaran V (2017) *Staphylococcus aureus* in some Brazilian dairy industries: changes of contamination and diversity. Front Microbiol. 8(1): e-2049.
- El-Salam MMA, Ibrahim SY (2014) Antimicrobial properties of 39 essential oils against thirteen food-borne microorganisms; efficacy and environmental hygiene of *Prunus armeniaca* in raw food preservation under cold storage. J Environ Occup Sci. 3(3): 162-169.
- Franciscato LMSS, Silva MR, Andrich F, Sakai OA, Doyama JT, Júnior AF, Moritz CMF (2018) Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils

of mint (*Mentha spicata* L.) and Surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.). *Orbital: Electron J Chem.* 10(6): 475-481.

- González AM, Tracanna MI, Amani SM, Schuff C, Poch MJ, Bach H, Catalán CAN (2012) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of the volatile oil and methanol extract of *Xenophyllum poposum*. *Nat Prod Commun.* 7(12): 1663-1666.
- Iñigo A, Palá-Paúl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A (2002) Essential oil composition from the aerial parts of *Haplophyllum linifolium* (L.) G. Don fil. *Bot Complut.* 26(1): 79-83.
- Maia AIV, Torres MCM, Pessoa ODL, Menezes JESA, Costa SMO, Nogueira VLR, Melo VMM, Souza EB, Cavalcante MGB, Albuquerque MRJR (2010) Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotifolia* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. *Quim Nova* 33(3): 584-586.
- Melo NI, Carvalho CE, Fracarolli L, Cunha WR, Veneziani RCS, Martins CHG, Crotti AEM (2015) Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Braz J Microbiol.* 46(2): 519-525.
- Montanari RM, Barbosa LCA, Demuner AJ, Silva CJ, Carvalho LS, Andrade NJ (2011) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D. *Quim Nova* 34(9): 1550-1555.
- NCCLS (2003) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. pp 1-47.
- Olenikov DN, Dudareva LV, Tankhaeva LM (2010) Chemical composition of essential oils from *Galeopsis bifida* and *Phlomis tuberosa*. *Chem Nat Compd.* 46(2), 316-318.
- Organji SR, Abulreesh HH, Elbanna K, Osman GEH, Khider M (2015) Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5(7): 515-520.
- Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK (2017) Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology* 7(1): e-2161.
- Peck MW, Vliet AHMV (2016) Impact of *Clostridium botulinum* genomic diversity on food safety. *Curr Opin Food Sci.* 10(1): 52-59.
- Pellegrini M, Ricci A, Serio A, Chaves-López C, Mazzarrino G, D'Amato S, Sterzo CL, Paparella A (2018) Characterization of essential oils obtained from abruzzo autochthonous plants: antioxidant and antimicrobial activities assessment for food application. *Foods* 7(2): e-19.
- Rahman A, Bonny TS, Stonsaovapak S, Ananchaipattana C (2011) *Yersinia enterocolitica*: epidemiological studies and outbreaks. *J Pathog.* 2011, ID239391.
- Raut JS, Karuppaiyl SM (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.* 62(1): 250-264.

- Santos JC, Filho CDC, Barros TF, Guimarães AG (2011) Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. *Semina: Ciências Agrárias* 32(4): 1557-1564.
- Santos DL, Ferreira HD, Borges LL, Paula JR, Tresvenzol LMF, Santos PA, Ferri PH, Sá S, Fiuza TS (2016) Chemical composition of essential oils of leaves, flowers and fruits of *Hortia oreadica*. *Braz J Pharmacog.* 26(1): 23-28.
- Souza SJO, Ferri PH, Fiuza TS, Borges LL, Paula JR (2018) Chemical composition and seasonality variability of the *Spiranthera odoratissima* volatile oils leaves. *Braz J Pharmacogn.* 28(1): 16-20.
- Steers E, Foltz EL, Graves BS (1959) An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother.* 9(5): 307-311.
- Valeriano C, Piccoli RH, Cardoso MG, Alves E (2012) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem familiar. *Rev Bras Pl Med.* 14(1): 57-67.

CAPÍTULO III - Bioatividades de óleos essenciais de diferentes partes de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae)

(Normas de acordo com a Revista Australian Journal of Crop Science, 2019)

Resumo

Na medicina popular brasileira, *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae) é usada para tratar doenças renais, hepáticas, dor de estômago, dores de cabeça e reumatismo. Este trabalho tem por objetivo investigar, pela primeira vez, a bioatividade *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) obtidos de folhas e flores de *S. odoratissima* cultivadas no Centro-Oeste do Brasil contra *Mycobacterium tuberculosis*, formas promastigota de *Leishmania amazonensis* e linhagens de células tumorais humana. Avaliamos a atividade antimicrobiana dos OEs em termos da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os OEs de folhas e flores mostraram ser antimicrobianos ativos contra *M. tuberculosis*, com valores de CIM de 150 µg/mL e 162,5 µg/mL, respectivamente. Ambos os OEs apresentam significativa atividade antiparasitária contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, com valores de CI₅₀ (50% de inibição do crescimento) de 14,36 ± 2,02 (OEs-folhas) e 19,89 ± 2,66 µg/mL (OEs-flores). A atividade antiproliferativa em linhagem celular normal (GM07492A, fibroblastos de pulmão) e tumorais (MCF-7, HeLa e M059J) foi realizada utilizando o ensaio XTT; os resultados foram expressos a partir do cálculo da Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular (CI₅₀) e o índice de seletividade foi calculado. OEs de folhas e flores apresentaram um CI₅₀ de 502,97 ± 40,33 µg/mL e 370,60 ± 2,01 µg/mL para a linhagem GM07492A, respectivamente. Observou-se atividade antiproliferativa contra todas as linhagens celulares tumorais humanas, com valores de CI₅₀ significativamente inferiores aos obtidos para a linhagem celular normal, demonstrando valores de CI₅₀ para a linhagem MCF-7 (367,57 ± 4,46 µg/mL para OEs folhas e 357,70 ± 1,85 µg/mL para

OEs flores) e M059J ($492,53 \pm 56,67 \mu\text{g/mL}$ para OEs folhas e $324,90 \pm 6,72 \mu\text{g/mL}$ para OEs flores). Estes resultados *in vitro* mostraram que OEs de *S. odoratissima* podem ser um possível candidato que atue como agente antimicrobiano, antiparasitário e antitumoral. No entanto, futuros estudos *in vivo* usando modelos experimentais são necessários para confirmar seus efeitos.

Palavras-chave: planta medicinal, *Leishmania amazonensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, células tumorais, β -cariofileno, fitoterapia.

Introdução

Os óleos essenciais (OEs) são sistemas multicomponentes naturais, complexos e compostos principalmente de terpenos e alguns outros componentes não terpenos. Especificamente, os OEs e seus constituintes exibem diferentes atividades biológicas, como atividades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antitumorais (SHARIFI-RAD et al., 2017). Eles consistem em misturas de vários compostos voláteis e solúveis em lipídios, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, que podem se difundir facilmente através das membranas celulares, uma grande vantagem em relação às interações com alvos intracelulares. Além disso, possíveis interações sinérgicas entre componentes de OEs são benéficas para suas atividades (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (manacá), uma espécie da família Rutaceae, é amplamente encontrada no cerrado brasileiro. Na medicina popular, suas folhas têm sido usadas para depuração sanguínea e prevenção de doenças renais e hepáticas. Elas também têm atividades ansiolíticas e anti-inflamatórias importantes; a última está diretamente relacionada à inibição da atividade da fosfolipase A2. Suas raízes têm sido aplicadas no tratamento de doenças do estômago, dores musculares, dores de cabeça, reumatismo e distúrbios hepáticos, além de depressão do sistema nervoso central (CHAIBUB et al. 2013; SOUZA et al. 2015; GALDINO et al. 2012).

A tuberculose (TB), causada pela microbactéria aeróbica *Mycobacterium tuberculosis* (MT), é a principal doença infecciosa causada por bactérias em todo o mundo. A bactéria tem forma de bacilo e pode ser disseminada pela exteriorização de material biológico contaminado, principalmente dos pulmões, pulverizando pequenas gotículas ao espirrar e tossir. Como o tecido pulmonar é rico em oxigênio, é muito favorável ao desenvolvimento desse microrganismo. No entanto, a MT é capaz de

permanecer latente mesmo em tecidos com boa concentração de oxigênio. Como resultado, não responde adequadamente ao tratamento anti-TB e permite que a doença recaia. Embora os pulmões sejam os responsáveis pelo maior número de casos, a TB extrapulmonar pode se desenvolver e ambos podem coexistir. Nesse caso, a microbactéria pode infectar diferentes tecidos humanos, como linfáticos, gastrointestinais, nervosos e até ósseos, além de levar à ampla disseminação denominada tuberculose miliar, que é extremamente perigosa (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2018).

A Organização Mundial da Saúde afirma que cerca de um terço da população mundial está infectada pelo MT e estima que uma em cada 10 pessoas contaminadas possa desenvolver TB. Sua incidência foi de cerca de 8,8 milhões de novos casos em 2010, quando cerca de 1,45 milhão de pessoas morreram; 25% delas foram vítimas de coinfeção por TB e HIV. Embora a África e a Ásia concentrem 86% dos casos de TB, o Brasil ocupa a 17ª posição entre 22 países que representam 80% de todos os casos. O Brasil estima que cerca de 50 milhões de pessoas foram infectadas pelo bacilo. Essa doença registrou 71 mil novos casos e 4,6 mil óbitos em 2010 no país, fato que a torna a quarta principal causa de morte por doenças infecciosas e a principal entre os pacientes com HIV. Os números mais alarmantes pertencem ao Rio de Janeiro e ao Amazonas, uma vez que os dois estados apresentam taxas de incidência semelhantes às encontradas na Ásia e na África (GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT, 2018).

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. Pode ocorrer de diferentes formas: viscerais, cutâneas, mucocutâneas e cutâneas difusas. A doença utiliza um hospedeiro invertebrado, um flebotomíneo, um flebotomíneo denominado mosquito-palha, responsável pela transmissão de formas promastigotas a animais selvagens e domésticos, além de humanos. Nos hospedeiros vertebrados, as formas promastigotas são trazidas para a célula pelos macrófagos, se transformam em formas amastigotas e, assim, propagam a infecção. No Brasil, a forma visceral é causada por *L. donovani*, enquanto as cutâneas e mucocutâneas são desencadeadas por infecções causadas por *L. tropica*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (KAUFFMANN et al., 2017).

Como a medicação convencional aplicada ao tratamento de certas doenças, como tuberculose e leishmaniose, resulta em efeitos colaterais adversos, é urgente o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficientes, seguros, menos tóxicos e menos agressivos. Portanto, estudos focados em alternativas naturais, investigando OEs que

possam revelar atividades promissoras anti-*Leishmania amazonensis* e anti-*Mycobacterium tuberculosis* foram exaustivamente realizados em todo o mundo (BERNUCI et al., 2016).

As estimativas mostram que cerca de 60% e 75% dos produtos farmacêuticos atualmente utilizados no tratamento de câncer e doenças infecciosas, respectivamente, derivam de fontes naturais. Assim, estudos de toxicidade e mutagenicidade são relevantes, pois contribuem para seu uso seguro e eficaz (FACHINETTO; TEDESCO, 2009). Como resultado, as plantas continuam chamando a atenção de pesquisadores e empresas farmacêuticas em estudos de protótipos que visam o desenvolvimento de novos medicamentos à base de compostos naturais. Nessa perspectiva, os OEs mostraram atividades biológicas promissoras, como antibacterianas, antiproliferativas e antiparasitárias, que desencadearam vários estudos sobre esse tipo de produto natural (ESTEVAM et al., 2017; SILVA et al., 2019).

Considerando o potencial medicinal de *S. odoratissima*, além da importância química e biológica dos OEs de plantas pertencentes à família Rutaceae (LIAQAT et al., 2018), e o interesse em aprofundar estudos de OEs de folhas e flores de *S. odoratissima* realizado por nosso grupo de pesquisa (CABRAL et al., 2019), este artigo descreve, as atividades antituberculares, antileishmaniais e antiproliferativas in vitro de OEs extraídos de folhas e flores de *S. odoratissima*.

Material e Métodos

Material Vegetal

Folhas e flores de *Spiranthera odoratissima* foram colhidas em Iporá, GO, Brazil (16°24'11,2''Sul e 51°06'41,4''Oeste) em novembro de 2017. A planta foi identificada pela botânica MSc. Erika Amaral, e uma exsicata (n° 1039) foi depositada no herbário em Rio Verde, no Instituto Federal Goiano (IFGOIANO).

Extração dos OEs

Folhas e flores frescas foram submetidas à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger por 3 horas (CABRAL et al., 2019). Para esse fim, 900 g de material vegetal foram divididos em três amostras de 300 g e 1000 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual, os traços de água remanescentes nos OEs foram removidos com o uso de sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. Os OEs foram armazenados em uma garrafa de âmbar e mantidos em geladeira a 4 °C até

análise posterior. O rendimento de OEs foi calculado a partir do peso de folhas e flores frescas e expresso como a média da análise em triplicata.

Análise GC-FID e GC-MS

As análises de cromatografia gasosa-ionização por chama e cromatografia gasosa-espectrometria de massa foram realizadas pelos sistemas Shimadzu QP2010 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As condições de GC-MS e GC-FID e a identificação de constituintes químicos de OEs foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Cabral et al. (2019).

Ensaio antitubercular *in vitro*

A estirpe *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) foi obtida da American Type Collection (ATCC) e mantida a -80 °C. A atividade antimicobacteriana de OEs de folhas e flores de *S. odoratissima* foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo CIM realizado em microplacas. A resazurina foi empregada para revelar o crescimento micobacteriano pelo método Resazurin Microtiter Assay (REMA) (PALOMINO et al., 2002). Os OEs foram diluídos em série (duas vezes) com caldo Middlebrook 7H9 (Difco™, Detroit, MI, EUA). O inóculo de micobactéria foi então adicionado para obter concentrações variando de 150 a 162,5 µg/mL. A isoniazida foi usada como controle positivo na concentração de 1,0 µg/mL, enquanto o caldo Middlebrook 7H9 e o inóculo foram utilizados como solvente e controle negativo, respectivamente.

Ensaio antileishmanial *in vitro*

Para avaliar a atividade antileishmanial, as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Posteriormente, cerca de 1×10^6 parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços e OEs, que haviam sido dissolvidos anteriormente em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO, solução-mãe 100 mM) (Synth), foram adicionados às culturas em concentrações que variavam de 3,12 a 50 µg/mL. A anfotericina B (Sigma Aldrich, 97% de pureza), em concentrações variando de 0,19 a 0,011 µg/mL, foi adicionada às culturas e usada como controle positivo. As culturas foram incubadas em uma incubadora de DBO (Quimis) a 25 °C por 24h. Então, a atividade antileishmanial foi determinada verificando se o crescimento das formas

promastigotas havia sido inibido. Foi observado contando o número total de promastigotas vivas na câmara de Neubauer (Global Glass, Porto Alegre, BR) com base na motilidade flagelar. Foi utilizado o meio RPMI 1640 (Gibco) com 0,1% de DMSO (Synth) (a concentração mais alta). Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de inibição do crescimento relacionada ao controle negativo (0,1% DMSO). As experiências foram realizadas em triplicata.

Ensaio antiproliferativo *in vitro*

Neste estudo, foram utilizadas as três linhas celulares tumorais a seguir: adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e glioblastoma humano (M059J). Uma linha celular humana normal (fibroblastos de pulmão, GM07492A) foi incluída para avaliar a possível atividade seletiva do produto natural sob investigação. Diferentes linhas celulares foram mantidas como monocamadas em meio de cultura de plástico (HAM-F10 + DMEM, 1:1, Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Nutricell), antibióticos (estreptomicina 0,01 mg/mL e penicilina 0,005 mg/mL; Sigma-Aldrich) e 2,38 mg/mL de HEPES (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas a 36,5 °C em atmosfera de CO₂ umidificada a 5%. A atividade antiproliferativa foi medida pelo *Toxicology Colorimetric Assay Kit in vitro* (XTT; Roche Diagnostics), de acordo com as instruções do fabricante. Nas experiências, as células (10⁴ células/poço) foram incubadas em microplacas de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 100 µL de meio HAM-F10/DMEM que continha óleo essencial em concentrações variando de 3,91 a 500 µg/mL. Foram incluídos os controles negativo (sem tratamento), solvente (DMSO a 0,4%, dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) e positivo (doxorubicina, DXR, Pharmacia Brazil Ltda.). Após incubação a 36,5 °C por 24h, o meio de cultura foi removido. As células foram lavadas com 100 µL de PBS (solução salina tamponada com fosfato) para remover tratamentos e expostas a 100 µL de meio de cultura HAM-F10 sem vermelho de fenol. Em seguida, foram adicionados 25 µL de XTT e as células foram incubadas a 36,5 °C por 17h. A absorbância da amostra foi determinada por um leitor de placas múltiplas (ELISA - Tecan - SW Magellan vs 5.03 STD 2P) no comprimento de onda de 450 nm e comprimento de referência de 620 nm. A atividade antiproliferativa foi avaliada com o uso de IC₅₀, a concentração capaz de inibir 50% do crescimento da linha celular como parâmetro de resposta, calculado pelo programa GraphPad Prism que representava a sobrevivência das células em relação às concentrações do produto natural

sob investigação. Foi utilizada ANOVA de uma via para comparar médias ($P < 0,05$). As experiências foram realizadas em triplicado. O índice de seletividade foi calculado dividindo o valor de IC_{50} dos OEs obtidos para as células GM07492A pelo valor de IC_{50} obtido para a linha de células cancerígenas.

Resultados

Os principais componentes dos OEs foram os hidrocarbonetos sesquiterpenos, seguidos pelos sesquiterpenos oxigenados. Os três principais componentes identificados nos OEs das folhas foram β -cariofileno (23,8%), biciclogermacreno (10,8%) e δ -cadineno (7,1%), enquanto os encontrados nos OEs das flores foram β -cariofileno (14,1%), espatulenol (8,1%) e γ -cadineno (7,2%). Dados completos sobre a composição química dos OEs podem ser encontrados em um artigo que acaba de ser publicado pelo grupo de pesquisa composto pelos autores deste estudo (CABRAL et al., 2019).

A atividade antimicobacteriana *in vitro* de OEs contra *M. tuberculosis* foi investigada em termos de valores de concentração inibitória mínima (CIM), em comparação com a isoniazida (controle positivo). A Tabela 1 resume os valores resultantes da CIM. Os OEs forneceram valores de CIM que variaram de 150 $\mu\text{g/mL}$ (OEs-folhas) e 162,5 $\mu\text{g/mL}$ (OEs-flores) contra o importante agente causador da TB.

Tabela 1. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de folhas e flores de *S. odoratissima* contra *M. tuberculosis*

	<i>M. tuberculosis</i> CIM ($\mu\text{g/mL}$)
OEs-Folhas	150
OEs-Flores	162,5
Isoniazida*	1,0

*Controle positivo

Em relação à atividade antileishmanial *in vitro* dos OEs de folhas e flores de *S. odoratissima*, os valores de IC_{50} foram de $14,36 \pm 2,02$ (OEs-folhas) e $19,89 \pm 2,66$ $\mu\text{g/mL}$ (OEs-flores) (Tabela 2). Os OEs de *S. odoratissima* inibiram o crescimento do parasita de maneira dependente da concentração/dose. A anfotericina B ($IC_{50} = 0,011 \pm 0,34$ $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antileishmanial de óleos essenciais de folhas e flores de *S. odoratissima*

Amostras	% de lise \pm DP /Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)					IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	50	25	12,5	6,25	3,12	
OEs-Flores	100 \pm 0,00	60,24 \pm 56,22	24,44 \pm 32,80	7,26 \pm 10,27	0,42 \pm 0,60	19,89 \pm 2,66
OEs-Folhas	97,01 \pm 4,22	76,05 \pm 33,14	39,69 \pm 39,84	16,10 \pm 4,66	12,48 \pm 17,65	14,36 \pm 2,02
	0,19	0,095	0,047	0,023	0,011	
Amph. B	99,88 \pm 0,60	78,33 \pm 24,43	68,74 \pm 21,97	54,67 \pm 17,77	42,44 \pm 20,97	0,011 \pm 0,34

Controle Negativo: Meio RPMI + 0,1% DMSO. Amph. B: Anfotericina B (controle positivo); DP: Desvio Padrão

A citotoxicidade de OEs de flores e folhas de *S. odoratissima* foi avaliada em relação à linha celular normal GM07492A; os valores de IC₅₀ foram 370,60 \pm 2,01 e 502,97 \pm 40,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Os OEs das flores foram avaliados em relação às linhas celulares tumorais MCF-7, HeLa e M059J, cujos valores de IC₅₀ foram 357,70 \pm 1,85, 376,47 \pm 6,45 e 324,90 \pm 6,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Tabela 3). Os OEs de folhas também foram avaliados contra as linhas de células tumorais MCF-7, HeLa e M059J; os valores de IC₅₀ foram 367,57 \pm 4,46, 523,37 \pm 1,93 e 492,53 \pm 56,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Os valores de IC₅₀ das linhas celulares MCF-7 e M059J foram significativamente inferiores aos da linha normal (GM07492A), ou seja, os índices de seletividade foram de 1,03 e 1,14 nos OEs das flores, enquanto os de OEs das folhas foram 1,36 e 1,02, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antiproliferativa de óleos essenciais de flores e folhas de *S. odoratissima* contra diferentes linhagens celulares

Linhagem celular	Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)					
	OE-flores		OE-folhas		DXR	
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS
GM07492A	370,60 \pm 2,01	-	502,97 \pm 40,33	-	0,5 \pm 0,2	-
MCF-7	357,70 \pm 1,85 ^a	1,03	367,57 \pm 4,46 ^a	1,36	62,1 \pm 2,0	-
HeLa	376,47 \pm 6,45	-	523,37 \pm 1,93	-	5,3 \pm 1,3	-
M059J	324,90 \pm 6,72 ^a	1,14	492,53 \pm 56,67 ^a	1,02	16,2 \pm 2,5	-

Valores de IC₅₀, 50% de inibição do crescimento celular; IS, índice de seletividade. GM07492A, fibroblastos de pulmão humano; MCF-7, adenocarcinoma de mama humano; HeLa, adenocarcinoma cervical humano; M059J, glioblastoma humano. Doxorubicina (DXR) foi usada como controle positivo. O índice de seletividade é a razão entre o valor de IC₅₀ de OEs de flores e folhas obtidas para células GM07492A e o valor encontrado para a linha de células tumorais. Os valores são médios \pm DP, n = 3. ^aSignificativamente diferente da linha celular normal (GM07492A) (P < 0,05).

Discussão

Como mencionado anteriormente, vinte e oito componentes foram identificados em óleos das folhas de *S. odoratissima* A. St. Hil., que exibiam cerca de 93,8% da composição total do óleo, enquanto vinte e nove componentes foram identificados nos óleos de suas flores, que mostraram cerca de 94,4% da composição total do óleo (CABRAL et al., 2019).

Os valores de CIM dos OEs de *S. odoratissima* contra *M. tuberculosis* são bastante promissores, uma vez que alguns autores consideram que CIMs \leq 200 $\mu\text{g/mL}$ indicam boa atividade contra *M. tuberculosis* (MOTA et al., 2018). Além disso, de acordo com Holetz et al. (2002), produtos naturais com valores de CIM inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$, entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ exibem boa atividade antimicrobiana, atividade antibacteriana moderada, atividade antibacteriana fraca e nenhuma atividade antibacteriana, respectivamente. Em relação aos constituintes químicos, alguns terpenos já tiveram sua atividade antimicobacteriana avaliada. Isoprenos, como monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois e fenóis relacionados, têm sido responsáveis pela atividade antimicobacteriana de OEs (BALDIN et al., 2018). Deve-se enfatizar que a promissora atividade antitubercular dos OEs de *S. odoratissima* pode ser atribuída ao β -cariofileno, um terpeno cuja atividade

biológica favorável já foi descrita na literatura, principalmente suas propriedades antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas (DAHAM et al., 2015).

Os OEs das flores ($IC_{50} = 19,89 \mu\text{g/mL}$) e folhas ($IC_{50} = 14,36 \mu\text{g/mL}$) de *S. odoratissima* foram considerados ativos contra *L. amazonensis*, uma vez que a literatura atribui o potencial antiparasitário dos OEs da seguinte forma: $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ é altamente ativo, $IC_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$ é ativo, $IC_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$ é moderadamente ativo e $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ é inativo (ESTEVAM et al., 2017). Deve-se mencionar que a promissora atividade leishmanicida dos OEs de *S. odoratissima* pode ser atribuída à alta concentração de β -cariofileno, um terpeno ativo contra *L. amazonensis* (SOARES et al., 2013).

Os resultados da atividade antiproliferativa destacam o β -cariofileno nos OEs de flores e folhas de *S. odoratissima*. Vários autores afirmam que esse composto é responsável pela atividade antitumoral de OEs. O germacreno D também foi descrito como um composto que pode influenciar positivamente a atividade antiproliferativa contra as linhas celulares de leucemia humana (HL-60). Os OEs das folhas de *Casearia sylvestris* exibiram citotoxicidade seletiva contra as linhagens celulares tumorais HeLa, A-549 e HT-29, devido à presença de ambos os terpenos β -cariofileno e α -humuleno. A atividade citotóxica exibida pelos OEs de *Eperua duckeana* pode ser causada por seus principais compostos (β -cariofileno ou germacreno D), pelo sinergismo entre eles ou com outros compostos encontrados nos OEs que podem ter efeitos aditivos e inibir o crescimento de células tumorais (LEANDRO et al., 2015). Além disso, Nascimento et al. (2018) observaram anteriormente que o valor de IC_{50} do espatulenol, um constituinte principal dos OEs de *S. odoratissima*, era de $49,3 \mu\text{g/mL}$ contra a linha de células tumorais MCF-7. Como resultado, sua citotoxicidade pode ser atribuída - pelo menos parcialmente - à atividade antiproliferativa desse sesquiterpeno.

Dois mecanismos de ação foram propostos pela literatura para explicar as atividades biológicas dos OEs. Ambos estão associados à hidrofobicidade de monoterpenos e sesquiterpenos, que costumam ser seus principais produtos químicos. A hidrofobicidade dos terpenoides pode permitir-lhes permear facilmente as membranas celulares, causando a morte de parasitas ou micro-organismos, afetando suas vias metabólicas ou organelas. Os OEs podem interagir com a membrana do parasita, causar mudanças fisiológicas drásticas, levar à permeabilidade reduzida da membrana e resultando em morte celular. Por outro lado, considerando o grande número de constituintes químicos e as interações sinérgicas ou antagônicas entre eles, os OEs

também podem atuar em alvos celulares além das membranas celulares, como lipídios e proteínas (LEMES et al., 2017).

Conclusão

Os OEs de *S. odoratissima* exibem atividades antituberculares, antileishmaniais e antiproliferativas *in vitro* promissoras. Os OEs estudados destacam-se como fontes promissoras de compostos bioativos que podem ser utilizadas no desenvolvimento de tratamentos alternativos para doenças negligenciadas, como a leishmaniose. Outro resultado favorável encontrado por este estudo é a atividade desses OEs contra o agente causador da TB.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à FAPEG, CNPq, IFGOIANO – Campus Rio Verde e CAPES pelo auxílio financeiro.

Referências

- Baldin VP, Scodro RBL, Lopes-Ortiz MA, Almeida AL, Gazim ZC, Ferarrese L, Faiões VS, Torres-Santos EC, Pires CTA, Caleffi-Ferracioli KR, Siqueira VLD, Cortez DAG & Cardoso RF (2018) Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae). *Phytomedicine* 47: 34-39.
- Bernuci KZ, Iwanaga CC, Fernandez-Andrade CMM, Lorenzetti FB, Torres-Santos EC, Faiões VS, Gonçalves JE, Amaral W, Deschamps C, Scodro RBL, Cardoso RF, Baldin VP & Cortez DAG (2016) Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. *Molecules* 21: 1698.
- Cabral FD, Alves CCF, Cabral RSC, Willrich GB, Crotti AEM & Miranda MLD (2019) Chemical constituents of essential oils extracted from the leaves and flowers of *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae). *Records of Natural Products* 13: 172-175.
- Chaibub BA, Oliveira TB, Fiuza TS, Bara MTF, Tresvenzol LMF & Paula JR (2013) Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15: 225-229.
- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MBK, Ezzat MO, Majid ASA & Majid AMSA (2015) The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20: 11808-11829.
- Estevam EBB, Deus IPB, Silva VP, Silva EAJ, Alves CCF, Alves JM, Casal CM, Magalhães LG, Pagotti MC, Esperandim VR, Souza AF & Miranda MLD (2017) *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from

- Protium ovatum* leaves (Burceraceae). Anais da Academia Brasileira de Ciências 89: 3005-3013.
- Fachinetto JM & Tedesco SB (2009) Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 11: 360-367.
- Galdino PM, Nascimento MVM, Florentino IF, Lino RC, Fajemiroye JO, Chaibub BA, Paula JR, Lima TCM & Costa EA (2012) The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 38: 276-284.
- Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Holetz FB, Pessini LG, Sanches RN, Cortez DAG, Nakamura VC & Day Son BP (2002) Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97: 1027-1031.
- Kauffmann C, Pacheco LA, Buhl B, Scheibel T, Freitas EM, Hoehne L, Machado GMC, Cavalheiro MMC, Gnoatto SCB & Ethur EM (2017) Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de espécies da família Myrtaceae, nativas do sul do Brasil. Revista Destaques Acadêmicos 9: 246-258.
- Liaqat I, Riaz N, Saleem QUA, Tahir HM, Arshad M & Arshad N (2018) Toxicological evaluation of essential oils from some plants of Rutaceae family. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2018: 4394687.
- Leandro LM, Veiga-Junior VF, Sales APB & Pessoa CÓ (2015) Composição química e atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* Cowan. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 14: 42-47.
- Lemes RS, Alves CCF, Estevam EBB, Santiago MB, Martins CHG, Santos TCL, Crotti AEM & Miranda MLD (2018) Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. Anais da Academia Brasileira de Ciências 90: 1285-1292.
- Matos LG, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Rezende MH, Bara MTF, Silveira EM, Costa EA & Paula JR (2014) Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. (Rutaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 16: 574-584.
- Mota APP, Dantas JCP & Frota CC (2018) Antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citrates*, *Plectranthus amboinicus*, and *Cinnamomum zeylanicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. Ciência Rural 48: e20170697.
- Nascimento KF, Moreira FMF, Santos JA, Kassuya CAL, Croda JHR, Cardoso CAL, Vieira MC, Ruiz ALTG, Foglio MA, Carvalho JE & Formagio ASN (2018) Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. Journal of Ethnopharmacology 210: 351-358.
- Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J & Portaels F (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 2720-2722.

- Sousa DP, Hocayen PAS, Andrade LN & Andreatini R (2015) A systematic review of the anxiolytic-like effects of essential oils in animal models. *Molecules* 20: 18620-18660.
- Silva EAJ, Estevam EBB, Silva TS, Nicoletta HD, Furtado RA, Alves CCF, Souchie EL, Martins CHG, Tavares DC, Barbosa LCA & Miranda MLD (2019) Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Brazilian Journal of Biology* 79: 697-702.
- Soares DC, Portella NA, Ramos MFS, Siani AC & Saraiva EM (2013) *Trans-β*-caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera spp.*). *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 761323.
- Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo MR, Ademiluyi AO, Sharifi-Rad R, Ayatollahi AS & Iriti M (2017) Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules* 22: 70.
- Raut JS & Karuppayil SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 62: 250-264.

CONCLUSÃO GERAL

Cerca de 93,8% da composição química total do óleo essencial das folhas de *S. odoratissima* A. St. Hil., foram identificados e cerca de 94,4% da composição total do óleo em suas flores, essa espécie mostrou-se um alto rendimento na composição química total do óleo essencial.

As propriedades inibidoras dos óleos essenciais tiveram eficiência contra esses patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*.

Deve-se mencionar que a atividade leishmanicida dos OEs de *S. odoratissima* pode ser atribuída à alta concentração de β -cariofileno, um terpeno ativo contra *L. amazonenses*. Os OEs de *S. odoratissima* exibem atividades antituberculares, antileishmaniais e antiproliferativas *in vitro* promissoras. Outro resultado favorável encontrado por este estudo é a atividade desses OEs contra o agente causador da TB, sendo o β -cariofileno, o principal constituinte dos OEs das folhas e flores de *S. odoratissima*, podendo ser o principal composto responsável por sua atividade antiproliferativa.

Pelos resultados satisfatórios em relação à atividade antimicrobiana, antileishmanial, antiproliferativa, dentre outras, indicaram que o OE da espécie estudada torna-se um agente eficaz no combate a esses patógenos causadores de doenças.