

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

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Citrus limonia* E *Citrus*
latifolia E DOS FRUTOS VERDES E FOLHAS DE *Protium*
ovatum

Autora: Elisângela Barbosa Borges Estevam
Orientadora: Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE- GO
Fevereiro-2017

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

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Citrus limonia*, *Citrus*
latifolia E *Protium ovatum* E DOS FRUTOS VERDES DE
Protium ovatum

Autora: Elisângela Barbosa Borges Estevam
Orientadora: Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

Rio verde- go
Fevereiro-2017

Estevam, Elisângela Barbosa Borges

E79c Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e dos frutos verdes e folhas de *Protium ovatum* / Elisângela Barbosa Borges Estevam. – Rio Verde. – 2017.

90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –
Câmpus Rio Verde, 2017.

Orientador: Doutora. Cassia Cristina Fernandes Alves .

Bibliografia

1. Palavra-chave *Trypanosoma cruzi*. 2. *Leishmania amazonenses*. 3. doenças parasitárias . 4. atividades antimicrobiana . 5. atividade citotóxica. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD: 634.3

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 ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS
DE *Citrus limonia* E *Citrus latifolia* E DOS FRUTOS
VERDES E FOLHAS DE *Protium ovatum***


Autora: Elisângela Barbosa Borges Estevam
Orientador: Cassia Cristina Fernandes Alves

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2017.


Prof. Dr. José Milton Alves
Avaliador externo
IF Goiano/RV


Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy
Avaliador interno
IF Goiano/RV


Prof.ª Dr.ª Mariana Buranelo Egea
Avaliadora interna
IF Goiano/RV


Prof.ª Dr.ª Cassia Cristina Fernandes
Alves
Presidente da Banca
IF Goiano/RV

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e estudo.

À minha família, que soube entender minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no mestrado, até a conclusão.

À minha mãe Isaura, minha guerreira, que deixou sua casa e sua vida para mim acompanhar e dar todo apoio a fim de que este sonho se tornasse realidade.

Ao meu amado esposo Aguivaldo, que me fez enxergar que a vida não é um mar de rosas, mas que viver entre espinhos é uma opção, e assim sendo, encorajou a seguir adiante.

A pessoa mais importante em nossas vidas, minha filha Ana, pela compreensão e ternura sempre manifestadas, apesar da minha falta de atenção e ausências em alguns momentos, você é o meu motivo para sempre querer ir em frente.

Ao meu pai Vilmar, que não está mais vivendo entre nós, mas que sempre me incentivou a seguir em frente, que foi durante sua curta vida, um exemplo de pai, de homem e de esposo, sei que hoje estaria orgulhoso, onde estiver estará sempre torcendo por mim.

Ao grupo “Quimicats”, minhas eternas irmãs Raiane e Vanessa, vocês tornaram essa luta mais fácil, passamos por tantas coisas juntas, choramos, rimos, dividimos comidas rrsr, mas hoje estamos vencendo, um ciclo de nossa vida, vai se fechando, e vocês se tornaram impossíveis de serem esquecidas, uma amizade que nasceu há dois anos, e cada dia se fortalece mais. Obrigado sempre por fazer parte da minha história.

A aluna de Iniciação Científica Isabelle, pela paciência, pela colaboração nos experimentos, e em especial pela amizade.

Agradeço a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de mestrado concedida e ao Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde-GO pela oportunidade.

À Prof.^a Dr^a Cristiane Cazal, pelo apoio e pela parceria, por revisar nossos trabalhos com tanto carinho e dedicação, que mesmo longe, e sem me conhecer pessoalmente ter acreditado no meu potencial. Obrigada professora;

Um especial agradecimento ao Prof. Dr. Mayker, pelos ensinamentos, por toda a sua colaboração. Agradeço pela aceitação e confiança em meu trabalho. Obrigada pela paciência com que sempre me ensinou a metodologia, por sempre estar presente, pelos conselhos e pela ajuda infinita que obtive, por ter aparecido em nossas vidas em um momento tão difícil e delicado, e mesmo indo embora, não desistiu de nos ajudar e incentivar. Mais que um professor, tem se tornado um amigo, obrigada sempre professor, em um curto espaço de tempo deixou em nós marcas profundas de amizade.

À Prof. Dr^a Cássia Cristina, professora que se tornou uma sincera amiga, um exemplo de pessoa a ser seguida e amada, que me acompanhou desde a Iniciação Científica, que guiou meus passos e acima de tudo acreditou no meu potencial para que pudesse ingressar na pesquisa, por vezes rimos, choramos, passamos por muitos momentos difíceis, aprendemos juntas. Obrigada pela atenção extrema com que sempre me recebeu, tanto na faculdade quanto em sua casa. Agradeço também pela dedicação especial com que corrigiu meus trabalhos e aulas, fazendo alterações e dando conselhos que me fizeram sempre melhorar ao longo desse tempo. Sabedoria, competência e humildade são características suas que sempre serão exemplos para mim. Obrigada pela preocupação com os meus assuntos pessoais e por sua compreensão em momentos difíceis, acredito que Deus tenha guiado a senhora em minha vida. Obrigada sempre.

Ao Professor José Milton, por toda a contribuição que tem oferecido e também pela sua amizade. Obrigada pela paciência com que sempre me ensinou, por sempre estar presente, pelos conselhos e pela ajuda infinita que obtive. Até hoje guardo com carinho os conselhos e o tempo que o senhor nos dedicou, muito do que hoje eu sei, devo ao senhor e aos seus conselhos, obrigada professor.

E àqueles que não foram citados, mas estiveram presentes nas horas em que mais precisei, seja para brindar, seja para rir, para abraçar, ou apenas compartilhar um silêncio.

Enfim, agradeço a todos que tiveram paciência comigo ao longo dessa jornada, que por vezes é estressante em seu percurso, porém é tão gratificante ao seu final.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural de Itumbiara-Goiás, filha de Isaura Barbosa Borges e Vilmar Tomé Borges, Elisângela Barbosa Borges, nasceu em 30 de setembro de 1983, e no ano de 2004 casou-se com Aguivaldo Alves Estevam, passando a se chamar Elisângela Barbosa Borges Estevam, quatro anos depois nasceu sua filha Ana Clara Barbosa Estevam. Em 2011, iniciou sua vida acadêmica, graduando em 2015 em “Licenciatura em Química”, ainda em 2011, iniciou na Iniciação Científica no Laboratório de “Química de Produtos Naturais”, desenvolvendo pesquisas acadêmicas com extratos e óleos essenciais de plantas, sob a supervisão da Prof. Dr.^a. Cássia Cristina Fernandes Alves; no ano de 2014, começou a atuar como professora na rede estadual de ensino em Goiás, atuando como professora de química. Em 2015, iniciou no curso de pós-graduação em Agroquímica no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Família Rutaceae	2
1.2. Famílias Burseraceae	4
1.3. Metabolismo especial e óleos essenciais.....	5
1.4. Aplicações dos óleos essenciais	6
1.5. <i>Trypanosoma Cruzi</i> e atividade tripanocida	6
1.6. <i>Leishmania</i> e atividade leishmanicida	8
1.7. Atividades antimicrobianas	10
1.8. Citotoxicidade dos óleos essenciais	11
1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
CAPÍTULO I - Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das folhas frescas de <i>Citrus limonia</i> Osbeck e <i>Citrus latifolia</i> Tanaka (Rutaceae)	23
RESUMO	23
CHAPTER I - Chemical composition and biological activities of the essential oils from the fresh leaves of <i>Citrus limonia</i> Osbeck and <i>Citrus latifolia</i> Tanaka (Rutaceae)	25
ABSTRACT	25
1.1. INTRODUÇÃO.....	27
1.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
1.2.1. Materiais vegetais	29
1.2.2. Extrações dos óleos essenciais	29
1.2.3. Análises dos óleos essenciais	30
1.2.4. Identificação dos constituintes dos óleos essenciais	30
1.2.5. Atividade antibacteriana	30
1.2.6. Atividade tripanocida	31
1.2.7. Atividade citotóxica.....	32

1.2.8. Atividade leishmanicida	33
1.3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1.4. CONCLUSÃO.....	38
1.6. REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II - Atividade tripanocida <i>in vitro</i> e composição química do óleo essencial dos frutos verdes de <i>Protium ovatum</i> (BURSERACEAE).....	43
RESUMO	43
CHAPTER II - <i>IN VITRO</i> ANTIPARASITIC ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL FROM GREEN FRUITS OF <i>Protium ovatum</i> (BURSERACEAE)	45
ABSTRACT	45
2.1. INTRODUÇÃO.....	46
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.2.1. Material vegetal.....	47
2.2.2. Obtenção do óleo essencial	47
2.2.3. Análise do óleo essencial por CG-EM	48
2.2.4. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i>	48
2.2.5. Avaliação da atividade citotóxica.....	49
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
2.4. CONCLUSÃO.....	52
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VITRO</i> E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>PROTIUM OVATUM</i>	57
RESUMO	57
CHAPTER III – <i>In vitro</i> Antiparasitary activity and chemical composition of the essential oil of the leaves of <i>Protium ovatum</i>	58
ABSTRACT.....	58
3.1. INTRODUÇÃO.....	59
3.2. MATERIAL E MÉTODO	61
3.2.1. Material vegetal.....	61
3.2.2. Obtenção do óleo essencial	61
3.2.3. Análise do óleo essencial por CG-EM.....	61
3.2.4. Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	62
3.2.5. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i>	63
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.4. CONCLUSÃO.....	67
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
3. CONCLUSÕES GERAIS	70
4. APÊNDICES	72

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<u>CAPÍTULO I</u>	
Tabela 1: Composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Citrus latifolia</i> e <i>Citrus limonia</i>	34
Tabela 2: Efeito inibidor dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>C. latifolia</i> e <i>C. limonia</i> frente à bactérias aeróbias e anaeróbias.....	35
Tabela 3: Atividade tripanocida dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>C. latifolia</i> e <i>C. limonia</i> frente à forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	37
Tabela 4: Atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>C. latifolia</i> e <i>C. limonia</i> sobre fibroblastos.....	37
Tabela 5: Atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>C. latifolia</i> e <i>C. limonia</i> frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	38
<u>CAPÍTULO II</u>	
Tabela 1: Composição química do óleo essencial de frutos verdes de <i>P. ovatum</i>	50
Tabela 2: Atividade tripanocida do óleo essencial de frutos verdes de <i>Protium ovatum</i> contra formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	51
Tabela 3: Atividade citotóxica do óleo essencial de frutos verdes de <i>P. ovatum</i>	52
<u>CAPÍTULO III</u>	
Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Protium ovatum</i>	64
Tabela 2: Atividade leishmanicida do óleo essencial das folhas de <i>P. ovatum</i> frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	65
Tabela 3: Atividade tripanocida do óleo essencial das folhas de <i>P. ovatum</i> frente à forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<u>INTRODUÇÃO</u>	
Figura 1: Indivíduo de <i>Citrus latifolia</i> . (A) Frutos. (B) Folhas. (C) Flores. (D) Ramo com folhas, flores e frutos.....	3
Figura 2: Indivíduo de <i>Citrus limonia</i> . (A) Flores. (B) Folhas e flores. (C) Ramos com frutos. (D) Frutos.	3
Figura 3: Indivíduo de <i>P. ovatum</i> . (A) Frutos. (B) Ramos com folhas e frutos. (C) Folhas.....	4
Figura 4- Inseto triatomíneo (A). Parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> (B).....	7
Figura 5: Ciclo de transmissão da <i>Leishmania amazonensis</i>	9
Figura 6: Fêmea de flebotomíneo.....	9
Figura 7: Cárie dentária (A) Gengivite (B).....	11
<u>CAPÍTULO I</u>	
Figura 1: Estrutura da p-sinefrina	27
Figura 2: Folhas, flor e frutos de <i>Citrus latifolia</i> (A). Folhas, flores e frutos de <i>Citrus limonia</i> (B).....	29
Figura 3: Estruturas químicas dos três constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas frescas de <i>Citrus limonia</i> e <i>Citrus latifolia</i> . (1) Limoneno, (2) Nerol e (3) 1,8-Cineol	34
<u>CAPÍTULO II</u>	
Figura 1: Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial de frutos verdes <i>P. ovatum</i> : (1) β -mirceno; (2) α -pineno e (3) limoneno.....	50
<u>CAPÍTULO III</u>	
Figura 1: Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de <i>P. ovatum</i> : (1) espatulenol, (2) óxido de cariofileno, (3) E-cariofileno e (4) mirceno.....	64

ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
<u>APÊNDICE A</u>	
Figura 1A. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de folhas frescas de <i>Citrus latifolia</i> (limão tahiti). (1) Limoneno; (2) Nerol; (3) 1,8-Cineol.....	72
Figura 2A. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de folhas frescas de <i>Citrus limonia</i> (limão china).). (1) Limoneno; (2) 1,8- Cineol; (3) Óxido de cariofileno.....	72
Figura 3A: Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas frescas de <i>Citrus limonia</i> e <i>Citrus latifolia</i> . (1) Limoneno, (2) Nerol , (3) 1,8-Cineol (4) Oxido de Cariofileno	73
<u>APÊNDICE B</u>	
Figura 1B: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de folhas de <i>P. ovatum</i> (vick do cerrado). (1) Espatulenol; (2) Óxido de cariofileno;(3) E- cariofileno (4) Mirceno.....	73
Figura 2B: Estruturas químicas dos quatros constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de <i>P. ovatum</i> : (1) espatulenol, (2) óxido de cariofileno, (3) E- cariofileno e (4) mirceno.....	74
Figura 3B: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de frutos verdes de <i>P. ovatum</i> (vick do cerrado). (1) β -Mirceno; (2) α -Pineno; (3) Limoneno.....	74
Figura 4B: Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial de frutos verdes <i>P. ovatum</i> : (1) β -mirceno; (2) α -pineno e (3) limoneno.	74

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
IR	Índice de retenção
UniRV	Universidade de Rio Verde
CG-EM	Cromatógrafo a gás acoplado a espectômetro de massas
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
LLCMK2	Linhagem de fibroblastos
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
VERO	Fibroblastos de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde Pública.

RESUMO

ESTEVAM, ELISÂNGELA BARBOSA BORGES. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2017. **Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia*, *Citrus latifolia* e *Protium ovatum* e dos frutos verdes de *Protium ovatum***. Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves “Orientadora”, Dr. Paulo Sérgio Pereira “Coorientador interno”, Dr.^a Cristiane de Melo Cazal “Coorientadora externa”.

As plantas possuem potencial terapêutico para cura de enfermidades, constituindo importante fonte de novos compostos biologicamente ativos, a partir dos metabólitos secundários. Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, caracterizados por permitirem que os vegetais adaptem ao ambiente em que estão inseridos. Atualmente, houve crescimento da aplicação desses óleos essenciais em indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas, no entanto, é importante ressaltar a necessidade de conhecer seus potenciais biológicos como também sua composição química, para que possa estabelecer a correlação entre essas potências e a sua composição química. Diante disso, objetivou-se neste estudo, determinar a composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus latifolia* e *Citrus limonia* e das folhas e frutos verdes de *Protium ovatum* e suas atividades antiparasitárias, bem como a atividade microbiana e citotóxica do óleo essencial das folhas de *Citrus latifolia* e *Citrus limonia* e atividade citotóxica do óleo essencial de frutos verdes de *Protium ovatum*. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação utilizando aparelho de cleveenger. A composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). A atividade tripanocida foi avaliada sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e a atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas do *Leishmania amazonenses*, a atividade citotóxica foi avaliada sobre fibroblastos e determinada pelo método do MTT. A atividade antibacteriana *in vitro*

frente às bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis* foi determinada pelo método de diluição em caldo. Quando avaliada a atividade citotóxica frente aos fibroblastos da linhagem LLCMK2, os óleos essenciais de *C. latifolia* ($CC_{50} = 502,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. limonia* ($CC_{50} = 422,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e dos frutos verdes de *P. ovatum* ($CC_{50} = 550,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram moderada citotoxicidade. Nas análises cromatográficas, foram identificados 17 constituintes químicos para *C. latifolia* e 18 constituintes químicos para *C. limonia*. Os componentes principais foram limoneno, nerol e 1,8-cineol. Já na espécie *P. ovatum* os terpenos espatulenol, óxido de cariofileno, *E*-cariofileno e o mirceno foram componentes majoritários do óleo essencial das folhas e β -mirceno, α -pineno e limoneno do óleo essencial dos frutos verdes. Os protozoários da família tripanossomatídea causam doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose e a tripanossomíase, em que os medicamentos disponíveis são de alto custo e de grande toxicidade para o hospedeiro. Neste contexto, os óleos essenciais das folhas de *C. latifolia*, *C. limonia*, *P. ovatum* e frutos verdes de *P. ovatum* foram avaliados frente às formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, apresentando valores de $CI_{50} = 51,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $88,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. A atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas de *C. latifolia*, *C. limonia* e *P. ovatum* foi avaliada frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, apresentando valores de $CI_{50} = 2,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. O óleo essencial de *C. latifolia* apresentou melhor resultado frente às bactérias *S. mutans*, *S. sanguinis* CIM ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$), enquanto o *C. limonia* foi mais promissor frente à bactéria *S. mitis* ($100 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Em suma, os óleos essenciais das folhas de *C. latifolia* e *C. limonia* apresentaram moderada atividade antibacteriana e os óleos essenciais das folhas e frutos verde de *P. ovatum* podem ser considerados excelente fonte alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários. Este trabalho descreve pela primeira vez a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e das folhas e frutos verdes de *Protium ovatum*, contribuindo significativamente para o conhecimento químico das espécies e suas atividades biológicas.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, doenças parasitárias, atividades antimicrobiana, atividade citotóxica.

ABSTRACT

ESTEVAM, ELISÂNGELA BARBOSA BORGES. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, *campus* Rio Verde – GO, February of 2017. **Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Citrus limonia* leaves, *Citrus latifolia* and *Protium ovatum* and the green fruits of *Protium ovatum*.** Dr^a Cássia Cristina Fernandes Alves “Adviser”, Dr. Paulo Sérgio Pereira “ Internal Co-adviser”, Dr^a Cristiane de Melo Cazal “ External Co-adivicer”.

Plants have a therapeutic potential for curing diseases, constituting an important source of new biologically active compounds, which are nowadays known as secondary metabolites. Essential oils originate from the secondary metabolism of plants, characterized by allowing the plants to adapt to the environment in which they are inserted. Nowadays there has been an increase in the application of these essential oils in food, cosmetic and pharmaceutical industries, but it is important to emphasize the need to know its biological potential as well as its chemical composition, so that it can establish a correlation between these potencies and the chemical composition of them. The objective of this study was to determine the chemical composition of the essential oil extracted from leaves of *Citrus latifolia* and *Citrus limonia* and of the green leaves and fruits of *Protium ovatum* and its antiparasitic activities, as well as the microbial and cytotoxic activity of the essential oil of Leaves of *Citrus latifolia* and *Citrus limonia* and cytotoxic activity of the essential oil of green fruits of *Protium ovatum*. The essential oil was obtained by hydrodistillation using Clevenger apparatus. The chemical composition was determined by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS), the trypanocidal activity was evaluated on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms and the leishmanicidal activity on *Leishmania amazonenses* promastigotes, cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts and determined by the MTT method, the in vitro antibacterial activity against the bacteria *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*,

Streptococcus sanguinis, *Streptococcus sobrinus* and *Bacteroides fragilis* by the broth dilution method. When evaluating the cytotoxic activity against fibroblasts from the LLCMK2 lineage, the essential oils of *C. latifolia* (CC50 = 502.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. limonia* (CC50 = 422.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), and the green fruits of *P. Ovatum* (CC50 = 550.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) showed moderate cytotoxicity. In the chromatographic analyzes were identified 17 chemical constituents for *C. latifolia* and 18 chemical constituents for *C. limonia*. The main components were limonene, nerol and 1,8-cineol. In the *P. ovatum* species, the terpenes espatulenol, caryophyllene oxide, E-caryophyllene and myrcene were major components of leaf essential oil and β -myrene, α -pinene and limonene of the essential oil of the green fruits. Protozoa from the trypanosomatid family cause neglected tropical diseases such as *leishmaniasis* and *trypanosomiasis*, where available drugs are highly costly and highly toxic to the host. In this context, the essential oils of the leaves of *C. latifolia*, *C. limonia*, *P. ovatum* and green fruits of *P. ovatum* were evaluated against the trypomastigote forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, presenting values of IC₅₀ = 51.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 88.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 1.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively. The leishmanicidal activity of the essential oils of the leaves of *C. latifolia*, *C. limonia* and *P. ovatum* were evaluated against the promastigotes of *Leishmania amazonensis*, presenting IC₅₀ = 2.03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2.63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 1.56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The essential oil of *C. latifolia* showed a better result against *S. mutans*, *S. sanguinis* CIM (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), whereas *C. limonia* was more promising for *S. mitis* bacteria (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). In summary, the essential oils of the leaves of *C. latifolia* and *C. limonia* presented moderate antibacterial activity and the essential oils of the green leaves and fruits of *P. ovatum* can be considered an excellent alternative source for the development of new antiparasitic medicines. This work describes for the first time the chemical composition of the essential oils of *Citrus limonia* and *Citrus latifolia* leaves and the green leaves and fruits of *Protium ovatum*, contributing significantly to the chemical knowledge of the species and its biological activities.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, parasitic diseases, antimicrobial activities, cytotoxic activity.

1. INTRODUÇÃO

Registros antigos mostram que as plantas têm papel fundamental no desenvolvimento da humanidade, desde a antiguidade elas são usadas pelo homem, na alimentação, na cura de doenças e também na agricultura. As plantas possuem substâncias biologicamente ativas, que são conhecidas na atualidade como metabólitos secundários ¹.

Os metabólitos secundários são produzidos pelas plantas, essa descoberta teve papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna; historicamente, pode se dizer que o desenvolvimento da química orgânica, ocorreu paralelamente ao estudo das plantas, que teve maior intensidade, datado a partir do século XIX, onde se tem início dos primeiros registros desses vegetais com base científica, resultando no isolamento de alguns princípios ativos das plantas ².

Para que um vegetal seja considerado como “planta medicinal”; é necessário que ele possua substâncias ativas que provocam no organismo humano reações que podem variar de cura a abrandamento da doença. No Brasil cresce a cada dia o uso de plantas com a finalidade terapêutica, mas pesquisadores alertam sobre a necessidade do uso moderado, para que assim possa evitar problemas com o uso indiscriminado desses produtos ³.

Neste contexto, o uso de plantas medicinais ou seus subprodutos podem ou não ter interferência no efeito terapêutico dos medicamentos convencionais ⁴. A resistência dos micro-organismos patogênicos a diferentes antimicrobianos tem sido relatado como um problema de saúde pública mundial, segundo a OMS (Organização mundial de saúde pública). Diante disso, os óleos essenciais apresentam como alternativa viável, pelas características descritas na literatura sobre suas propriedades biológicas diferenciadas, tendo uso em vários seguimentos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas ⁵.

1.1 Família Rutaceae

A família Rutaceae é constituída por 160 gêneros e mais de 2000 espécies disseminadas em todo o mundo, porém, no Brasil, está sendo representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies ⁶ Essa família é caracterizada por possuir membros fortemente aromáticos, fato que se deve a presença de óleos essenciais, possuindo importância considerável como fonte de frutas cítricas e ornamentais ⁷.

O gênero *Citrus* se destaca como um dos mais importantes da família Rutaceae, sendo que seu cultivo tem aumentado mundialmente, esse aumento se deve ao fato da importância de seus frutos e de seu valor nutricional ⁸. Seus óleos essenciais são usados como subprodutos em indústrias de suco, sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque na produção de óleos essenciais de *Citrus* ¹⁰.

Existem funções biológicas comprovadas para o gênero *Citrus*, dentre elas podemos citar o *Citrus limon* que é usado na medicina popular para fins terapêuticos como anti-inflamatório, bactericida, antidepressivo, tratamento de febre e tosse ¹¹. O *Citrus medica* tem amplo uso em doenças respiratórias, mas sua ação antialérgica em rinite alérgica sazonal foi comprovada em estudos *in vitro* ¹². As folhas de *Citrus aurantifolia* são utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão no tratamento de gripe, e ainda há relatos do uso dessa espécie para tratamento de doenças respiratórias ¹³. O óleo essencial da casca de seus frutos apresentaram atividade sedativa, e o suco *in vitro* apresentou atividade antibacteriana, essas propriedades biológicas são atribuídas a β -adrenérgica da sinefrina, um glicosídeo encontrado em espécies de *Citrus* ¹².

A espécie *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) é um fruto de origem tropical com exploração econômica recente, seus frutos são considerados precoces, sendo relatado que a partir do terceiro ano possui uma produção de frutos significativa ¹⁴. Essa espécie pode ser cultivada tanto em terras de areia como em argila, no entanto é muito sensível ao frio, às geadas e alta temperatura. Suas vantagens são o sabor e a ausência de sementes, suas florações mais abundantes ocorrem entre setembro e outubro sendo os picos de produção concentradas entre janeiro e junho ¹⁵. A literatura não apresenta estudos sobre os óleos essenciais das folhas desta espécie, há, porém poucos relatos com o óleo essencial extraídos da casca, podendo destacar atividade sedativa ansiolítica, composição química ¹⁶ e influência enzimática na extração de óleo essencial ¹⁷.

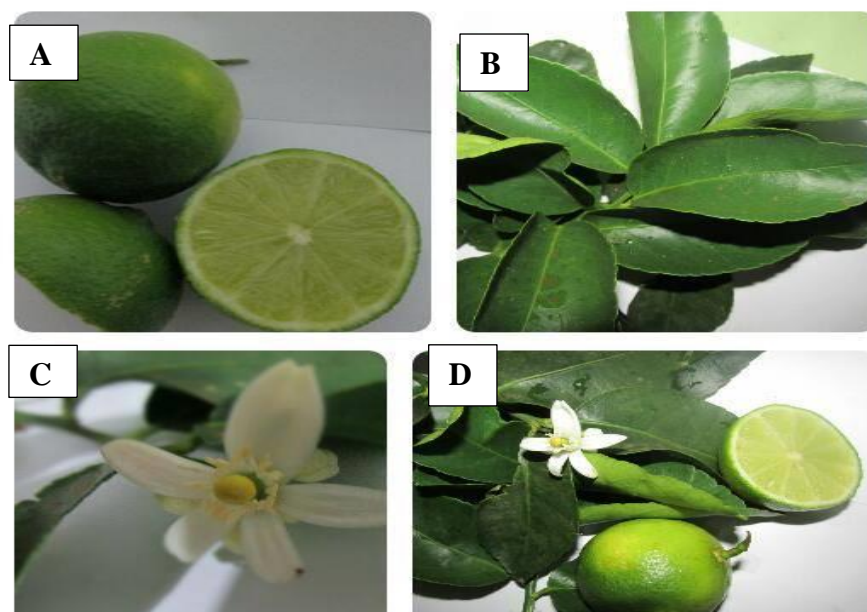


Figura 1: Indivíduo de *Citrus latifolia*. (A) Frutos. (B) Folhas. (C) Flores. (D) Ramo com folhas, flores e frutos. Fonte: Própria

A espécie *Citrus limonia* Osbeck é um fruto originário da Índia conhecida como limão china, limão rosa ou limão vinagre¹⁸. Essa espécie é cultivada em pomares e viveiros, possuindo como vantagem a indução da maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início de safra e ainda pode ser usado como porta – enxerto¹⁹. Não há relatos na literatura sobre o estudo com óleo essencial das folhas desta espécie, porém é reportado que o óleo essencial extraído da casca, embora tenham apresentado atividade inseticida, não foi eficaz contra o ensaio larvicida de *Aedes aegypti*²⁰.

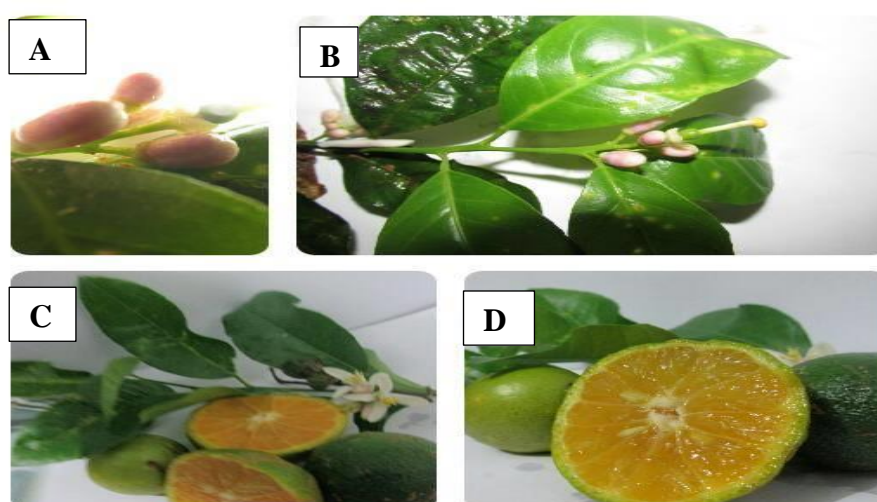


Figura 2:: Indivíduo de *Citrus limonia*. (A) Flores. (B) Folhas e flores. (C) Ramos com frutos. (D) Frutos. Fonte: Própria

É reportado na literatura que o óleo essencial extraídos das folhas de *C. limettioides* apresentou moderada atividade antibacteriana quando testados frente às bactérias *Staphylococcus aureus*⁷, assim como outras espécies do gênero *Citrus* também apresentaram atividades biológicas consideráveis, como a ação antifúngica do óleo essencial das folhas de *C. medica*²¹, atividade leishmanicida de óleos essenciais de *C. limonia* e *C. latifolia*¹⁹.

1.2. Famílias Burseraceae

A família Burseraceae é composta por 18 gêneros com aproximadamente 700 espécies²². Essa família ocorre em regiões tropicais do mundo, com maior concentração na América Tropical, Malásia e noroeste da África. Suas espécies são muito ricas em gomas e resinas, que possuem valor considerável no mercado mundial²³. O gênero *Protium* se destaca como o principal gênero desta família com 150 espécies. É reportado na literatura que as espécies dessa família são conhecidas por suas resinas, que são ricas em óleos essenciais, triterpenos e outros constituintes, além de que, algumas de suas espécies são produtoras de óleo essencial com potencial de aplicação em indústria²².

A espécie *Protium ovatum* é distribuída nos cerrados e cerradões de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais e é mais rara em Sergipe, Bahia e São Paulo, sua floração é de abril a setembro, com frutos em setembro²³. É conhecida como vick do cerrado e é endêmica do Brasil, com ocorrência tanto no bioma Cerrado quanto na Amazônia²⁷. Com exceção do trabalho de Castelo²⁵, sobre rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C; IV) do óleo essencial de suas folhas, a literatura não apresenta dados sobre estudos com esta espécie.

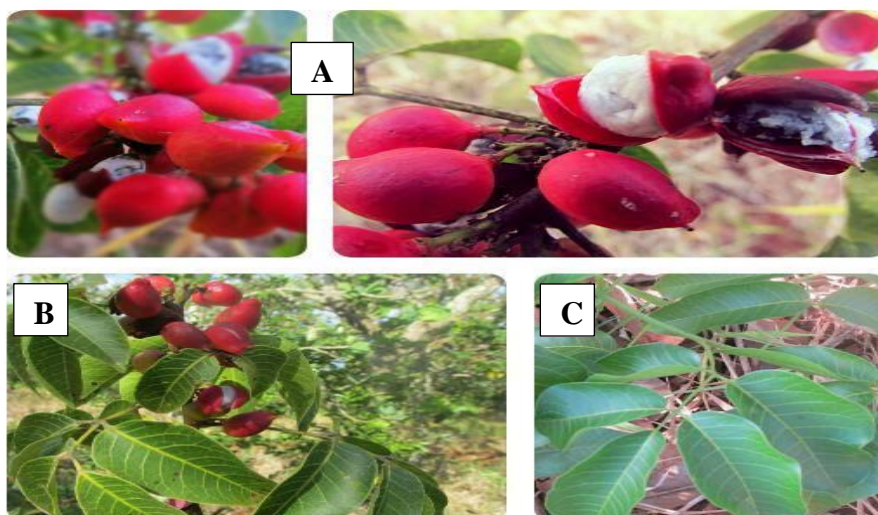


Figura 3: Indivíduo de *P. ovatum*. (A) Frutos. (B) Ramos com folhas e frutos. (C) Folhas. Fonte: Própria).

1.3. Metabolismo especial e óleos essenciais

As plantas produzem uma variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento, esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais ²⁶, eles se caracterizam por uma distribuição diferenciada entre grupos taxonômicos dentro do reino vegetal. Em contrapartida, os metabólitos primários são encontrados em todas as plantas e desempenham papel metabólito que são essenciais e evidentes no desenvolvimento do vegetal ²⁷. Os metabólitos secundários se diferenciam dos metabólitos primários por apresentarem distribuição diferenciada no reino vegetal, significando que certos metabólitos secundários são restritos a uma espécie ou a um grupo de espécies relacionadas ²⁶.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de diversas partes de plantas, possuem composição química complexa que facilita ao vegetal maior adaptação ao meio na qual estão inseridas ²⁸. A variação genética, nutrição das plantas, aplicação de fertilizantes, estresse durante o crescimento, clima, localização geográfica são fatores que podem influenciar na composição química dos óleos essenciais, além disso, o tipo de material utilizado e o método de extração determinam o rendimento e composição química, determinando suas propriedades biológicas ²⁹.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos em duas séries, conforme sua rota biossintética: a aromática constituída pelos fenilpropanoides e a série terpênica ³¹. É reportado na literatura que vários fatores que podem influenciar na composição química dos óleos essenciais, principalmente a origem do vegetal, por isso cada óleo tem uma composição química específica, sendo relatados casos de serem constituído por mais de 300 componentes químicos diferentes ³⁵.

A extração do óleo essencial pode ocorrer por diferentes processos, levando em conta a localização no vegetal, quantidade e a característica do produto final ³⁴. Os métodos de extração mais utilizados são hidrodestilação, destilação a vapor e extração por fluido supercrítico ³⁵; porém em escala comercial, o método de extração a vapor se destaca como o mais utilizado ³².

1.4. Aplicações dos óleos essenciais

Os produtos naturais e seus derivados são fontes importantes na descoberta de novos compostos bioativos, diante disso, os óleos essenciais possuem várias aplicações, como por exemplo, na saúde, agricultura, cosméticos e indústrias alimentares ³². Os perfumistas declaram que os óleos essenciais são um modo de eternizar fragrâncias e odores, mas há relatos na literatura comprovando que a eficácia dos óleos essenciais vai muito além da satisfação de seus aromas para indústrias de perfumaria e cosméticos ³².

É descrito que os produtos naturais como óleo essencial e extratos de plantas possuem propriedades antimicrobianas e antivirais conferindo a esses produtos vários tipos de aplicações, como preservação de alimentos crus e processados, produtos farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais ³³ evitando o crescimento de patógenos alimentares e microrganismo resistentes aos antibióticos ⁶.

Os microrganismos estão em constante evolução, tornando mais resistentes e aparecendo novas doenças infecciosas, com considerável toxicidade de alguns dos medicamentos. Agentes antimicrobianos derivados de produtos naturais surgem como uma tentativa de limitar o risco no desenvolvimento de resistência microbiana. Neste contexto os óleos essenciais e seus componentes se destacam como fonte promissora no desenvolvimento de novos fármacos, eles interagem com a membrana celular e acumulam-se na bicamada lipídica de bactérias, ocupando um espaço entre as cadeias de ácidos graxos ³⁴.

1.5. *Trypanosoma Cruzi* e atividade tripanocida

A doença de Chagas foi descoberta no ano de 1909 pelo médico Carlos Chagas ³⁷. É uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que possui o corpo alongado com uma membrana ondulante (figura 4 B), que auxilia na movimentação pela corrente sanguínea ³⁶. É considerada uma doença infecciosa (com fase aguda ou crônica) e é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença negligenciada ³⁸. A doença de Chagas possui um forte impacto social, pois entre todas as doenças infecciosas e parasitárias da América Latina, fica atrás apenas de doenças respiratórias, diarreia e AIDS ³⁷.

É reportado na literatura, que ao contrário de outras doenças transmitidas por insetos hematófagos, em que a infecção ocorre pela inoculação do agente etiológico

junto com a saliva do inseto, na doença de chagas, quando o barbeiro pica, ele defeca durante ou logo após a sucção do sangue, eliminando o parasito nas fezes, esses parasitos podem penetrar pelo orifício causado pela picada, pelas mucosas, ou por feridas na pele ³⁷. Embora a infecção vetorial seja a mais importante à transfusão de sangue, a transmissão oral, placentária ou congênita através do canal de parto no momento do nascimento também é relatada, outra forma possível seria a transmissão direta do reservatório de *T. cruzi*, especialmente envolvendo marsupiais que eliminam o *T. cruzi* através das glândulas odoríferas e podem transmitir o parasita a outros animais e aos seres humanos ³⁹.

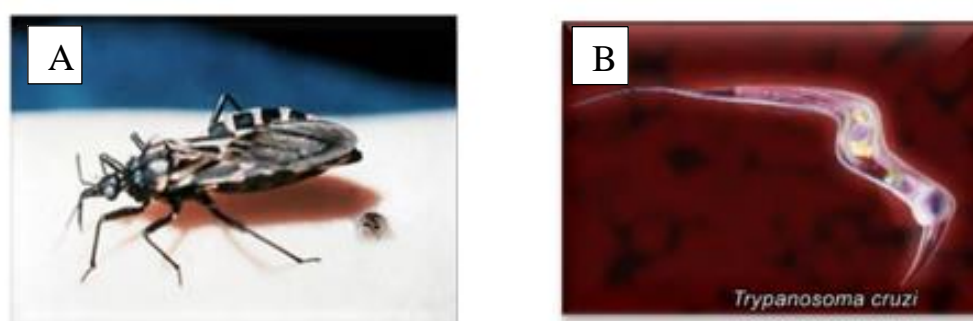


Figura 4: Inseto triatomíneo (A). Parasita *Trypanosoma cruzi* (B). Fonte Ferreira (2015).

Novos casos da doença de chagas são diagnosticados diariamente em vários países e continentes, até mesmo lugares que não são considerados endêmicos para a doença ³⁷. No Brasil, 1,5 a 2 milhões de pessoas aproximadamente estão infectadas com *T. cruzi* e 20% da população correm risco de contrair a infecção ⁴². Uma preocupação é o acesso precário aos cuidados e a dificuldade no fornecimento dos diagnósticos e tratamento para pessoas com a doença. O diagnóstico requer a realização de pelo menos dois testes sorológicos diferentes, tornando financeiramente desafiadores ⁴³.

O óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* apresentou concentração inibitória de (CI₅₀ 311,82 µg.mL⁻¹). Para atividade tripanocida os óleos essenciais de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* ¹⁹ apresentaram resultados mais promissores (88,2 µg.mL⁻¹), (51,7 µg.mL⁻¹) respectivamente, sendo considerada moderadamente ativa.

Até o momento, existem apenas dois tipos de fármacos disponíveis para o tratamento da doença, o benzonidazol e nifurtimox ⁴³. Essas drogas apresentam elevada toxicidade para o ser humano ⁴⁴, e possuem efeitos colaterais e baixa efetividade na fase crônica da doença ⁴⁵. Os produtos naturais tem sido uma alternativa eficiente, são

economicamente viáveis e biodegradáveis, e em alguns casos exibem alta atividade contra insetos vetores e baixa toxicidade contra mamíferos ⁴⁶.

1.6. *Leishmania* e atividade leishmanicida

A leishmaniose é uma doença parasitária não infecciosa causada por vários protozoários do gênero *Leishmania*, são transmitidas para o ser humano através da picada por fêmeas de espécies distintas de flebotomíneos ⁴⁷. Essa doença é endêmica em 98 países sendo que a cada ano ocorrem cerca de 2 milhões de novos casos. A leishmaniose está entre as doenças tropicais negligenciadas e a OMS já considera a leishmaniose em conjunto com outras doenças parasitária um problema de saúde pública internacional ⁴⁸.

Essa doença pode apresentar sob duas formas clínicas: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LTA) ⁴⁹. A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica sistemática com características clínicas de evolução grave, e se não for tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90 % dos casos ⁵⁰. A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum da doença, é reportado na literatura que essa doença pode apresentar sob duas formas: a cutânea que é caracterizada por lesões indolores e formato arredondado ou ovalado e a mucosa (mucocutânea) que é caracterizada pela formação de úlceras que acomete a região da laringe, nasofaringe e cavidade oral ⁴⁹.

A leishmaniose tegumentar é considerada pela OMS como uma das doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância para a saúde pública no Brasil ⁵¹. A LTA é uma doença infecciosa e não contagiosa, é primariamente uma infecção zoonótica que afeta outros animais que não o homem, que pode ser envolvido secundariamente, e a transmissão ocorre através da picada das fêmeas de flebotomíneos infectados ⁵². A LTA pode se manifestar inicialmente na pele, com caráter parecido com hanseníase, e as formas promastigotas foram inoculadas pelo mosquito, no entanto para ter um diagnóstico clínico, leva-se em consideração à espécie do parasita e a reação do sistema imunológico do paciente, e pode ficar restrita ao local da inoculação do parasita, ou alcançar novos sítios na pele e nas mucosas do nariz, laringe e orofaringe ⁵³.

No Brasil, a LTA é representada pelas seguintes espécies: *Leishmania brasilienses*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis* ⁵¹. A *Leishmania amazonensis* possui alto potencial patogênico, tendo sido relatado que esta espécie em questão já teve registros de lesões cutâneas, difusas e viscerais ⁵⁴.

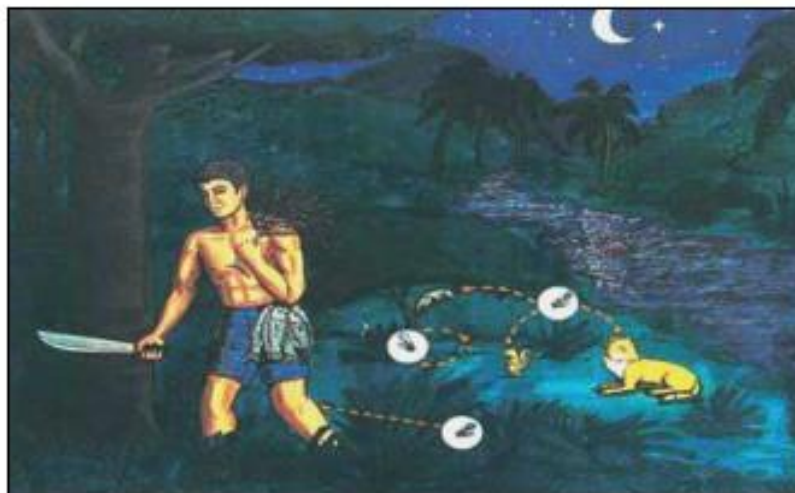


Figura 5: Ciclo de transmissão da *Leishmania amazonensis*. Fonte: COELHO, 2010.

Os compostos antimoniais é o principal tratamento contra a leishmaniose, mas apresenta alta toxicidade e resistência em algumas regiões endêmicas ⁴⁵. Além dos antimoniais, anfotericina B e miltefosina podem ser utilizadas como alternativas terapêuticas, no entanto, esses medicamentos têm efeitos secundários tóxicos ⁵⁴. Diante da falta de vacinas eficazes, o surgimento de resistência aos fármacos existentes e a ausência de tratamentos menos tóxicos e acessíveis se tornam urgente e extremamente importante a descoberta de novos compostos para o desenvolvimento terapêutico ⁵⁶. Alguns óleos essenciais, ou compostos isolados obtidos a partir das plantas, têm apresentados bastante promissores e efetivos contra leishmanicida, fazendo com que esses compostos sejam bastante promissores no tratamento da leishmaniose ⁵⁷.



Figura 6: Fêmea de flebotomíneo. Fonte: COELHO, 2010.

1.7. Atividades antimicrobianas

Matérias-primas derivadas das plantas são alternativas viáveis na busca por novos fármacos, pois os produtos naturais podem causar menos efeitos colaterais do que medicamentos sintéticos, eles apresentam várias propriedades terapêuticas, além de ser de baixo custo e maior benefício para a população ⁵⁸. Diante disso, tem aumentado o interesse em pesquisas com produtos naturais, visando a obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem a prevenção e o tratamento de doenças bucais, com o intuito de obter o máximo de efetividade com o menor dano possível ao organismo humano ⁵⁹.

Cárie dentária é uma doença periodontal provocada principalmente por bactérias do gênero *Streptococcus* ⁵⁸. É descrito que a cárie é uma infecção decorrentes de acúmulo de bactérias na superfície dentária formando um biofilme ⁶⁰, formando a placa dentária é quando ela é formada por diversas comunidades microbiológicas ⁶¹. O biofilme é a primeira etapa para a formação das lesões de cáries, sua formação depende da interação dos microrganismos com o dente e dos microrganismos entre si, sendo caracterizada por vários estágios, até chegar ao biofilme “maduro” ⁶².

Algumas espécies do gênero *Streptococcus* são colonizadores primários dos biofilmes dentais ⁶³. As bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus* são agentes patogênicos que atacam o esmalte dos dentes e tecido gengival estando diretamente ligadas a cárie e doenças periodontais ⁶⁴. A *Bacteroides fragilis* é uma bactéria anaeróbia com afinidade para colonização na mucosa, mas essa bactéria compreende uma pequena fração da microbiota fecal ⁶⁵.

Os produtos naturais têm surgido como alternativa para tratamento e prevenção de cárie dental, doença periodontal e candidíase ⁶⁶. Diante disso, os óleos essenciais estão associados a efeitos anti-inflamatórios e antioxidante ⁶⁷, agregando a eles valor terapêutico, no entanto ainda é recente o uso da fitoterapia no tocante da saúde bucal ⁶⁸.

Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia* e *Thymus vulgaris* apresentaram propriedades biológicas ativas, quando testados frente à inibição de *S. aureus* e *S. mutans* ⁶⁹, os óleos essenciais, como timol, eucaliptol, metil salicilato e mentol demonstraram capacidade de reduzir o biofilme pré-formado e retardar o desenvolvimento do biofilme existente, sendo descrito que enxaguatórios bucais contendo óleo essencial 0,7 % de cloreto de cetilpiridínio, quando aplicados diariamente

reduziram efetivamente a inflamação gengival e afetaram moderadamente a microbiota subgengival, reduzindo as proporções de patógenos periodontais ⁷⁰.

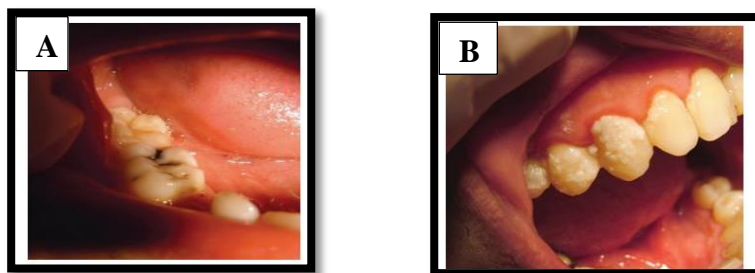


Figura 7: Cárie dentária (A) Gengivite (B). Fonte: PEGADO, 2010.

Ainda não há no mercado um antibiofilme que apresente inocuidade aos tecidos bucais, reduza a formação do biofilme bacteriano, não favoreça o desenvolvimento de bactérias resistentes e não manchar os dentes, reforçando assim a necessidade de pesquisas alternativas ou complementares no controle da cárie dental, que apresente boa efetividade e menos efeito diverso, dessa forma os produtos naturais tem se destacado como alternativa aceitável no controle do biofilme oral que é a principal causa da formação de cárie dental ⁵⁹.

1.8. Citotoxicidade dos óleos essenciais

O potencial das plantas para a sociedade é descrito como fármacos alternativos empregados pelo homem na cura de enfermidades, esse conhecimento histórico que atravessa o tempo, foi passado de geração para geração ⁷². O Ministério da Saúde no Brasil, no ano de 2006, através portaria n° 648, Política Nacional de Atenção Básica, reconheceu e incluiu as plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS) como um tratamento alternativo ⁷³. No entanto, é importante ressaltar, que deve se ter cuidado, pois o uso imprudente das plantas, para finalidades diferentes daquelas tradicionalmente empregadas, podem causar sérios danos à saúde pública ⁷⁴.

Remédios fitoterápicos correspondem 25% do receituário médico dos países desenvolvidos e 80% dos países em desenvolvimento, apesar do amplo uso desses fitomedicamentos, ainda há muito para ser estudado e avaliado sobre o potencial terapêutico e a toxicidade desses produtos, pois, ao contrário do que se imagina o uso indiscriminado das plantas, sem qualquer base científica, mesmo sendo classificada como “produtos naturais” e devido a esse fato, acreditam que estão isentas de reações

adversas, podem apresentar vários danos à saúde, incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos ⁷⁵.

Os testes de toxicidades são realizados com intuito de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos ⁷⁶. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste que avalia a biocompatibilidade de qualquer material, e somente depois de comprovada sua não toxicidade a pesquisa deve ter seguimento ⁷⁷.

Os óleos essenciais têm se destacado pela variedade de diversidade biológica relacionado a eles ⁷⁸. No entanto, as plantas podem causar vários tipos de reações, desde alergias na pele e mucosas, até distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e em alguns casos o óbito ⁷⁹. Diante desse fato, é importante reconhecer as características farmacológicas e toxicológicas dos óleos essenciais, para promover maior segurança na utilização dos produtos naturais ⁷⁴.

1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teses e Dissertações: SOARES, H.C.P. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. [Link]
2. MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S.; Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova* 2001, 24, 105. [[CrossRef](#)]
3. SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista brasileira de plantas medicinais* 2009, 11. [[CrossRef](#)]
4. OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; FILHO, R.N.S. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2006, 16, 77. [[Link](#)]
5. MILLEZI A.F.; BAPTISTA N.N.; CAIXETA D.S.; ROSSONI D.F.; CARDOSO M.G.; PICCOLI R.H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. bras. plantas med.*, 2013,15. [[CrossRef.](#)]
6. CARVALHO, R.B.F.; ALMEIDA, A.A.C.; FREITAS, R.M.; LIMA, L.S.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M.; FEITOSA,C.M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon (L.) Burm.* *Química Nova* 2013, 36, 1375. [[CrossRef](#)]
7. LOPES, T.A.L.; PAULA, J.R.; TRANSVENZOL, 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 limettoides* Tanaka (Rutaceae). *Rev. Ciencia Farm Básica Apl.* 2013, 34, 503. [[Link](#)]
8. VIANA, F.M.P.; LIMA, J.S.; CARDOSO, J.E. MARTINS, M.V.V. reação de cultivares de tangerina à antracnose sob diferentes sistemas de irrigação. *Summa phytopathologica* 2015, 41. [[Link](#)]
9. GERHARDT, C.;WIEST, J.M.; GIROLOMETTO, G.; DA SILVA, M. A.S.; WESCHENFELDER, S. Aproveitamento da casca de Citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Braz. J. Food Technol* 2012.[[CrossRef.](#)]

10. BIZZO, H.R.; HOVELL, M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quím. Nova* 2009, 32. [[CrossRef](#)]
11. CAMPELO, L.M.L., SÁ, C.G., FEITOSA, C.M., SOUSA, G.F., FREITAS, R.M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae), *Revista brasileira plantas medicinais* 2013, 15. [[Cross Ref](#)]
12. PRUDENTE, R.C.C.; MOURA, R.B. Evidências científicas para a indicação popular de algumas espécies da família Rutaceae no tratamento de doenças respiratórias na região Sudeste do Brasil. *Infarma Ciências Farmacêuticas*. 2013, 25. [[Link](#)] .
13. VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev. bras. Farmacogn.* 2005, 15. [[CrossRef](#)].
14. MENDONÇA, L.M.V.L.; CONCEIÇÃO, A.; PIEDADE, J.; CARVALHO, V.D.; THEODORO, V.C.A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2006, 26. [[CrossRef](#).]
15. Teses e Dissertações: [VIANA, D. S.; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.](#) [[Link](#)]
16. Teses e Dissertações: [GARGANO, A. C. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Janeiro, 2007.](#) [[Link](#)]
17. Teses e Dissertações: [CASSINI, J.; Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, 2010.](#) [[Link](#)]
18. Web pages com autor: PASTORE, M.; RODRIGUES, R.S.; SIMÃO- BIANCHINI, R.; FILGUEIRAS, T.S. Plantas exóticas invasoras na reserva biológica do alto da serra de Paranapiacaba. 2012. Disponível em < http://botanica.sp.gov.br/files/2013/09/virtuais_5guiacampo.pdf>. Acessado em 15 de setembro de 2016.
19. ESTEVAM E B B, MIRANDA, M.L.D.; ALVES, J. M.; EGEA, M. B.; PEREIRA, P. S.; MARTINS, C. H. G.; ESPERANDIM, V. R.; MAGALHÃES, L. G.; BOLELA. Composição química e atividade biológicas dos óleos essenciais das

- folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *RVq* 2016, 8, 1842. [[CrossRef](#)]
20. CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A. L.; SANTANA, E.W. Atividade larvicida de óleos essenciais de plantas brasileiras contra *Aedes aegypti* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004, 99. [[CrossRef](#)]
 21. SANTOS, D.L.; PEREIRA, T.C.L.; FERREIRA, H.D.; SÁ, S.; TRESVENZOL, L.M.F.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R.; FIUZA, T.S.; BORGES, L.L. Estudo da anatomia foliar e caulinar e análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas e cascas dos frutos de *Citrus medica* L. *Electronic Journal of Pharmacy* 2016, 13, 229. [[Link](#)]
 22. MARQUESI, D.D.; SARTORI, R.A.; LEMOSI, T.L.G.; MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N.; MONTE, F.J.Q. Composição química dos óleos essenciais das duas subespécies de *P. heptaphyllum*. *Acta Amazonica*. 2010, 40. [[CrossRef](#)]
 23. Web pages com autor: LIMA L R, PIRANI J R, BURSERACEAE IN, WANDERLEY M G L, SHEPHERD G J, MELLEM T S, MARTINS S E, KIRIZAWA M e GIULIETTI AM. 2005 (eds) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de botânica. 04:163-168. Disponível em: <<http://botanica.sp.gov.br/files/2016/02/Burseraceae.pdf>> Acessado em: 26 de março de 2016.
 24. Web pages com autor: Daly, D.C. 2015 *Burseraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB16660> Jardim Botânico do Rio de Janeiro > Acesso em: 26 de março de 2016.
 25. CASTELO, A.V.M.; MENEZZI, C.H.S.D.; RESCK, I.S. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. *Cerne* 2010, 16. [[CrossRef](#)]
 26. Livros: TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5ª. Ed, 2013.
 27. CROTEAU, R. KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. (2000). CAP. 24. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. Ed. American Society of Plant Physiologists. [[Link](#)]
 28. MIRANDA, C.A.S.F., CARDOSO, M.G., BATISTA, L.R., RODRIGUES, L.M.A., FIGUEIREDO, A.C.S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies:

- propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Rev. Ciênci. Agron.* 2016, 47. [[CrossRef](#)]
29. RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 2014, 62, 250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. ANDRADE, M. A., CARDOSO, M.G., CARDOSO, M.G., BATISTA, L.R., MALLETT, A.C.T., MACHADO, S.M.F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica* 2012, 43, 399 [[Link](#)]
31. Teses e Dissertações: ORLANDA, J.F.F.; Tese de Doutorado, Universidade Federal de João Pessoa, 2011. [[Link](#)]
32. ALMEIDA, M.P.; ROMERO R.B.; CRESPIAN, E.R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: uma proposta de projeto para a Educação Básica. *Latin American Journal of Science Education* 2015, 02. [[Link](#)]
33. SILVEIRA, J.C. COSTA, A.O.S., JUNIOR, E.F.C. Modelagem da extração de óleos essenciais empregando coeficiente de difusão variável. *Engenharia agrícola* 2015, 35. [[CrossRef](#)]
34. JIANG, Y.; WU, N.; FU, YI-JIE.; WANG, M.; LUO, M.; ZHAO, C. J.; ZU, Y.G.; LIU, X.L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2011, 32, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. RASHID, S.; RATHER, M.A.; SHAH, W.A.; BHAT, B.A. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food chemistry* 2013, 138, 693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Livros: GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba, 2014.
37. OLIVEIRA, M.T.; BRANQUINHO, R.T.; ALESSIO, G.D.; MELLO, C.G.C.; PAIVA, N.C.N.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; REIS, A.B.; FILHO, O.A.M.M.; LANA, M. TcI, TcII and TcVI *Trypanosoma cruzi* samples from Chagas disease patients with distinct clinical forms and critical analysis of *in vitro* and *in vivo* behavior, response to treatment and infection evolution in murine model. *Acta Tropical.* 2017, 167, 108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. DIAS et al. III Concenso brasileiro em doença de Chagas. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2016, 25, 7. [[Link](#)]

39. COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015, 110. [[Cross Ref](#)]
40. Teses e Dissertações: FERREIRA, V.F; Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo-SP, 2015. [[Link](#)]
41. RIBEIRO, A.R.; MENDONÇA, V.J.; ALVES, R.T.; MARTINEZ, I.; ARAUJO, R. F.; MELLO, F.; ROSA, J.A. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil . *Revista de Saúde Pública* 2014, 40. [[CrossRef](#)]
42. MATOS, C.S.; JÚNIOR, J.E.S.; MEDEIROS, F.A.C.; FURTADO, E.; DIAS, J.C.P. Current situation and perspectives regarding human Chagas disease in midwestern of the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014, 109.[[CrossRef](#)]
43. CUCUNUBÁ, Z.M., GOEHLER, J.M.M., DIAZ, D., NOUVELLET, P., BERNAL, O. MARCHIOL, A., BESANEZ, M.G., CONTEH, L. How universal is coverage and access to diagnosis and treatment for Chagas disease in Colombia? A health systems analysis. *Social Science & Medicine* 2017, 4. [[Cross Ref](#)]
44. SOUZA-SOBRAL, E.C., LEITE, N, F., BRITO, D.I.V., LAVOR, A.K.L.S., ALENCAR, L.B.B., ALBUQUERQUE, R.S., FERREIRA, J.V. A., FREITAS,M.A., MATIAS, E.F.F., ANDRADE,J.C., TINTINO, S.R., MORAIS-BRAGA, M.F.B., VEGA,C., HENRIQUE, D.M. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do α -pineno e carvacrol Cytotoxic and antiparasitic in vitro activities of α -pinene and carvacrol. *Acta Toxicol. Argent.*2014, 22, 76.[[Link](#)]
45. ANTINARELLI, L.M.R.; PINTO, N.C.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2015. 87. [[CrossRef](#)]
46. FIGUEIREDO, M.B.; GOMES, G.A.; SANTANGELO, J.M.; PONTES, E.G.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; CARVALHO, M.G. Lethal and sublethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae) and monoterpenes on Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2017, 112. [[Cross Ref](#)]

47. SILVA, A.A.S.; MORAES, S.M.; MARTINS, C.G.; ARAUJO, F.M.V. Antileishmanial and antioxidant potential of the ethanol extract of croton *Argyrophylloides muell. arg.* *Electronic Journal of Pharmacy* 2016, 13, 165. [[Link](#)]
48. OLIVEIRA, R.Z.; OLIVEIRA, L.Z.; LIMA, M.V.N.; LIMA, A.P.; LIMA, R.B.; SILVA, D.G.; LOPES, F.R.G. Leishmaniose tegumentar americana no município de Jussara, estado do Paraná, Brasil: série histórica de 21 anos. *Revista de Saúde Pública do Paraná* 2016, 17. [[CrossRef](#)]
49. OLIVEIRA, E.N., PIMENTA, A.M. Perfil epidemiológico das pessoas portadoras de leishmaniose visceral no município de Paracatu - MG no período de 2007 a 2010. *Revista Mineira de Enfermagem* 2014, 18. [[CrossRef](#)]
50. PELISSARI, D.M.; CECHINEL, M.P.; GOMES, M.L.S.; JUNIOR, F.E.F.L. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2011, 20. [[CrossRef](#)]
51. SANTOS, J.B.; MARCHI, P.G.F.; SILVA, A.L.F. Leishmaniose Tegumentar Americana Humana e Leishmaniose Visceral humana no município de pontal do Araguaia – Mato Grosso. *Revista UNIVAR* 2016, 1, 59. [[Link](#)]
52. SANTOS, J.L.C.; MELO, M.B.; FERREIRA, R.A.; FONSECA, A.F.Q.; VARGAS, M.F.L.; GONTIJO, C.M.F. *Saúde Social* 2014, 23, 1033. [[CrossRef](#)]
53. FERREIRA, C.C.; MAROCHIO, G.G.; PARTATA, A.K. Estudo sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana com enfoque na farmacoterapia. *Revista Científica do ITPA* 2012, 5. [[Link](#)]
54. SILVA, S.S.; MIRANDA, M.M.; COSTA, I.N.; WATANABE, M.A.E.; PAVENELLI, W.R.; FELIPE, I.; SFORCIN, J.M.; COSTA, I.C. Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in *Leishmania amazonenses*. *Semina* 2015, 32, 25. [[CrossRef](#)]
55. Teses e Dissertações: COELHO, L.I.A.R.C.; Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, 2010. [[Link](#)]
56. MITTRA, B.; SILVA, M.F.L.; MENEZES, J.P.B.; JENSEN, J.; MICHAILOWSKY, V.; ANDREWS, N.W. A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for *Leishmania amazonensis* Virulence. *PLoS Pathog.* 2016, 12. [[CrossRef](#)]
57. Teses e Dissertações: ROTTINI, M.M.; Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011. [[Link](#)]

58. FURTADO, N.A.D.E.O.C.; SAMPAIO, T.O.; XAVIER, M.A.; MEDEIROS, A.D.D.E.; PEREIRA, J.V. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2015, 17.[[Cross Ref](#)]
59. ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; TROVÃO, D.M.M.B.; MEDEIROS, A.C.D.; COSTA, E.M.M.B. Atividade Antimicrobiana “In Vitro” de Extratos Hidroalcoólicos de Plantas Mediciniais do Nordeste Brasileiro em Bactérias do Gênero *Streptococcus*. *Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clínica Integrada* 2013, 13, 233.[[CrossRef](#)]
60. SILVA, M.S.A.; SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus offi cinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008, 18, 236. [[CrossRef](#)]
61. Vieira, D.R.P.; Amaral, F.M.M.; Maciel, M.C.G.; Nascimento, Flávia F.R.F.; Libério, A.S. Plantas e constituintes químicos empregados em Odontologia: revisão de estudos etnofarmacológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* em patógenos orais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2014, 16. [[Link](#)]
62. ALVES, T.M.S.; SILVA, C.A.; SILVA, N.B.; MEDEIROS, E.B.; VALENÇA, A.M.G. Atividade Antimicrobiana de Produtos Fluoretados sobre Bactérias Formadoras do Biofi lme Dentário: Estudo in vitro. *Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clínica Integrada* 2010, 10, 209.[[CrossRef](#)]
63. Teses e Dissertações: [BARBIERI, D.S.V; Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2014.](#) [[Link](#)]
64. ESTEVAM, E.B.B ; SILVA, E.M. ; MIRANDA, M.L.D. ; ALVES, J.M. ; PEREIRA, P.S. ; SILVA, F.G. ; ESPERANDIM, V.R. ; MARTINS, C.H.G. ; AMBROSIO, M.A.L.V. ; TÓFOLI, D. ; JUNIOR, L.R.A.; ALVES, C.C.F. Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcoólico das raízes de *Tradescantia sillamontana* Matuda (Veludo Branco) (Commelinaceae). *Rev. bras. plantas med.* 2016, 18. [[Link](#)]
65. BOLEIJ, A.; HECHENBLEIKNER,E.M.; GOODWIN,A.C.; BADANI,R.; STEIN, E.M.; LAZAREV,M.G.; ELLIS,B. CARROLL,K.C.;ALBESIANO,E.; WICK,E.C.; PLATZ,E.A.; PARDOLL,D.M.; SEARS, C.L. The Bacteroides

- fragilis Toxin Gene Is Prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients. *Clinical Infectious Diseases* 2015, 60, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. CASTILHO, A.R.; MURATA, R.M.; PARDI, V. Produtos naturais em odontologia. *Revista Saúde*. 2007. [[Link](#)]
67. Teses e Dissertações: SOUZA, I.P. Dissertação de Mestrado, Ribeiro Preto –SP, 2014. [[Link](#)].
68. ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; BARREIRA, S. M. W.; NAKASHIMA, T.; CURY, C. D; COSTA, C. K. Enxaguatório bucal: Principais ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcolico de *Salvia officinalis* L. *Visão acadêmica* 2007, 8. [[Link](#)]
69. FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Rev. bras. plantas med.* 2014, 16 [[Link](#)].
70. FILOGÔNIO, C.F.B.; PENIDO, C.V.S.; SOARES, R.V.; CRUZ, R.A. A Efetividade de Óleos Essenciais no Controle Químico do Biofilme e na Prevenção da Cárie Dentária. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* V.11, n.3,p.465-69, 2011. [[CrossRef](#)]
71. Web pages com autor: PEGADO, J.J.N. Licenciatura (Medicina dentária) – Universidade Fernando Pessoa. 2010. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/1922/2/MONO_12908.pdf>. Acessado em: 26 de Janeiro de 2017.
72. FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, S.G. CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS. *Cad. Pesq* 2011, 18. [[Link](#)]
73. SILVA, D. S. M. A.; REIS, J. J ; BRANDÃO, H. N. ; NEVES, M. S.; BRANCO, C. R. C.; ANDRADE, A. P. E. N.; OLIVEIRA, M. C. Avaliação da aroeira (*schinus terebinthifolius raddi*) no tratamento da mucosite oral induzida pela radioterapia exclusiva ou associada à quimioterapia: estudo piloto. *Revista de Saúde Coletiva da UEFS* 2016, 6, 59. [[CrossRef](#)]
74. ARAÚJO, E.J.F.; ARAÚJO, D.Y.M.L.; FREITAS, R.M.; FERREIRA, P.M.P. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. *Revista de Ciências Farmacêuticas* 2014, 35, 355. [[LinK](#)]

75. BELCAVELLO, L.; CUNHA, M.R.H; ANDRADE,M.A.; BATITUCCI, M.C.P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicina. *Natureza on line* 2012. 10, 140. [[LinK](#)]
76. LIMA, J.M.; SILVA, C.A.; ROSA, M.B.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.G.; SILVA, M.B. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta Daninha* 2009, 27. [[CrossRef](#)]
77. ROGERO S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* 2003, 6. [[CrossRef](#)]
78. ROSA, C.S.; VERAS, K.S.; SILVA, P.R.; LOPES NETO, J.J.; CARDOSO, H.L.M.; ALVES, L.P.L.; BRITO, M.C.A.; AMARAL, F.M.M.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, O.S.; MORAES, D.F.C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2016, 18,19.
79. CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. *Rev. Bras. Pl. Med* 2016, 18, 373.[[Cross Ref](#)]

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar os compostos presentes nos óleos essenciais de *Citrus limonia*, *Citrus latifolia* e *Protium ovatum* e avaliar a atividade biológica desses óleos essenciais.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar os constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e do óleo essencial das folhas e frutos verdes de *Protium ovatum*;
- Determinar a atividade antiparasitária dos óleos essenciais das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e do óleo essencial das folhas e frutos de *Protium ovatum*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias orais *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Bacteroides fragilis*;
- Verificar o efeito citotóxico do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia*.

CAPÍTULO I - Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae)

(Artigo publicado *Revista virtual de Química*. 2016, 8, 1842-1854. DOI: 10.21577/1984-6835.20160124)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar pela primeira vez a composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e avaliar seus efeitos: antibacteriano, tripanocida, leishmanicida e citotóxico *in vitro*. Os óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG-EM. O rendimento do óleo foi de 0,8% para *C. latifolia* e 0,5% para *C. limonia*, sendo identificados 17 constituintes químicos para *C. latifolia* e 18 constituintes químicos para *C. limonia*. Os componentes principais foram limoneno (46,3%), nerol (10,0%) e 1,8-cineol (13,4%). Foi avaliada a atividade antibacteriana *in vitro* frente às bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis* pelo método de diluição em caldo. Protozoários da família tripanossomatídea causam doenças tropicais negligenciadas como a tripanossomíase, para as quais estão disponíveis poucos medicamentos. Neste contexto, os óleos essenciais das folhas frescas de *C. limonia* e *C. latifolia* foram avaliados frente às formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, apresentando valores de $CI_{50} = 88,2 \mu\text{g/mL}$ e $51,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Quando avaliada a atividade citotóxica frente aos fibroblastos da linhagem LLCMK₂, os

óleos essenciais de *C. limonia* ($CC_{50} = 422,9 \mu\text{g/mL}$) e *C. latifolia* ($CC_{50} = 502,9 \mu\text{g/mL}$) apresentaram moderada citotoxicidade. A atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. limonia* e *C. latifolia* foi avaliada frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, apresentando valores de $CI_{50} = 2,63 \mu\text{g/mL}$ e $2,03 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados demonstram que os óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* apresentaram moderada atividade antibacteriana e tripanocida e expressiva atividade leishmanicida.

Palavras-chave: *Citrus limonia*; *Citrus latifolia*; sesquiterpenos; atividade antibacteriana; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania amazonensis*; citotoxicidade.

CHAPTER I - Chemical composition and biological activities of the essential oils from the fresh leaves of *Citrus limonia* Osbeck and *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae)

(Published article *Virtual Journal of Chemistry*, 2016, 8, 1842-1854 DOI: 10.21577 / 1984-6835.20160124)

ABSTRACT

This study aimed at determining, for the first time, the chemical composition of the essential oils from fresh leaves of *Citrus limonia* and *Citrus latifolia* and evaluating its *in vitro* antibacterial, trypanocidal, leishmanicidal and cytotoxic effects. The essential oils from fresh leaves of *C. latifolia* and *C. limonia* were extracted by hydro distillation and analyzed by GC-MS. The oil yield was 0.8% for *C. latifolia* and 0.5% for *C. limonia*, whereas 17 and 18 chemical components were identified for *C. latifolia* and for *C. limonia*, respectively. Major components were limonene (46.3 %), nerol (10.0 %) and 1,8-cineole (13.4 %). *In vitro* antibacterial activity was evaluated against the bacteria *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* and *Bacteroides fragilis* by the broth dilution method. Protozoa of the Trypanosomatidae family cause neglected tropical diseases, such as *trypanosomiasis*, whose treatment has depended on few available drugs. Therefore, the essential oils from fresh leaves of *C. limonia* and *C. latifolia* were also evaluated against the Y strain of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, resulting in $IC_{50} = 88.2$ $\mu\text{g/mL}$ and 51.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Regarding the evaluation of the cytotoxic activity against fibroblasts LLCMK₂ line, the essential oil from *C. limonia* ($CC_{50} = 422.9$

$\mu\text{g/mL}$) and *C. latifolia* ($\text{CC}_{50} = 502.9 \mu\text{g/mL}$) showed moderate cytotoxicity. The leishmanicidal activity of the essential oils from fresh leaves of *C. limonia* and *C. latifolia* were evaluated against promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, resulting in $\text{IC}_{50} = 2.63 \mu\text{g/mL}$ and $2.03 \mu\text{g/mL}$, respectively. Thus, the essential oils from fresh leaves of *Citrus limonia* and *Citrus latifolia* had moderate antibacterial and trypanocidal activities and significant leishmanicidal activity.

Key words: *Citrus limonia*; *Citrus latifolia*; sesquiterpenes; antibacterial activity; *Trypanosoma cruzi*; *Leishmania amazonensis*; cytotoxicity.

1.1. INTRODUÇÃO

A família Rutaceae apresenta 150 gêneros e 1.500 espécies, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, sul da África e Austrália. No Brasil, a família está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica.¹

As espécies do gênero *Citrus* são ricas em flavonoides, óleos voláteis, cumarinas e pectinas. Estudos anteriores demonstraram que o óleo volátil da casca do fruto de *Citrus aurantium* apresenta atividade sedativa e hipnótica, ao contrário do extrato etanólico das folhas, que não apresenta estas atividades. O suco dos frutos de *C. aurantium* exibiu também atividade antimicrobiana *in vitro* e, pela presença da *p*-sinefrina (Figura 1), produziu redução do consumo de alimento e do ganho de massa corporal e reduziu a pressão portal em ratos.²

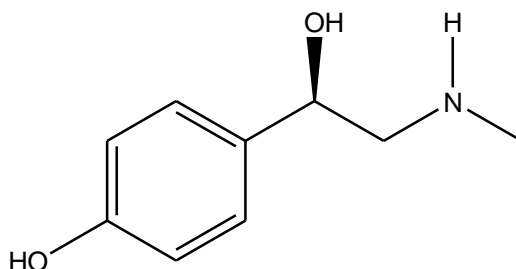


Figura 1: Estrutura da *p*-sinefrina

O presente trabalho aborda o estudo de óleos essenciais (OEs) que podem ser extraídos de plantas através da técnica de arraste a vapor, por hidrodestilação utilizando o aparato clewenger e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação. Estes óleos são compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas.³

Em especial, os óleos cítricos são muito versáteis e são principalmente utilizados como aromatizantes em bebidas, sabonetes, cosméticos, produtos domésticos

entre outros. Esses óleos são também bastante usados em tratamentos médicos e são conhecidos por exibir propriedades antimicrobianas, como antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitária.⁴

A espécie *Citrus latifolia* Tanaka (limão tahiti) é um fruto de origem tropical, de exploração econômica relevante. Os principais produtores são o México, EUA (Flórida), Egito, Índia, Peru e Brasil. No Brasil, destaca-se o Estado de São Paulo que é o maior produtor deste fruto, tendo participação em 81,3% da produção, seguido por Rio de Janeiro e Bahia, com 3,9% e 2,7%, respectivamente.⁵

A espécie *Citrus limonia* Osbeck, é conhecida como limão china ou limão rosa sendo extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra, além de ser utilizado como porta-enxerto.⁶

Derivados de plantas como extratos vegetais, óleos essenciais, e compostos puros, já foram avaliados em relação aos seus efeitos antimicrobianos contra agentes patogênicos orais como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis*. Estes derivados têm atraído o interesse de grupos de pesquisa, uma vez que podem ser empregados no desenvolvimento de novas soluções para enxague bucal utilizado na higiene oral. No entanto, relatos sobre a atividade antimicrobiana de produtos naturais contra patógenos bucais ainda são escassos.⁷

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de 17 doenças consideradas infecções crônicas comuns em pessoas mais carentes, de países menos desenvolvidos.⁸ Neste cenário, destaca-se a doença de Chagas, que é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e que atualmente, conta apenas com, a quimioterapia como forma de tratamento específico disponível para esta doença, sendo benzonidazol o medicamento utilizado.⁹

A leishmaniose é outra doença infecciosa não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente. O tratamento é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem gerar resistência do parasito.¹⁰

O objetivo deste trabalho foi determinar pela primeira vez a composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de duas espécies de *Citrus* ocorrentes no

sudoeste goiano, *Citrus latifolia* e *Citrus limonia* (Figura 2), e avaliar seu efeito antibacteriano, tripanocida, leishmanicida e citotóxico *in vitro*.

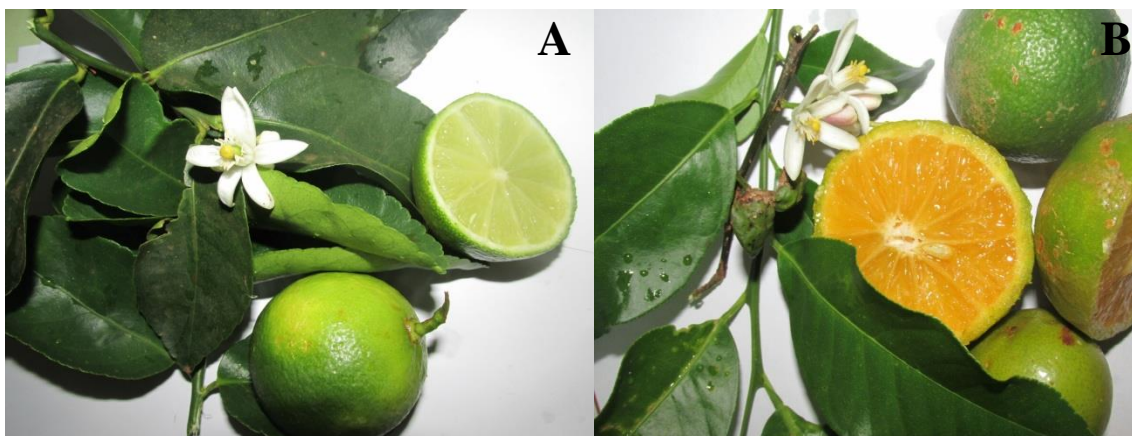


Figura 2: Folhas, flor e frutos de *Citrus latifolia* (A). Folhas, flores e frutos de *Citrus limonia* (B).

1.2. PARTE EXPERIMENTAL

1.2.1. Materiais vegetais

As folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foram coletadas na região de Rio Verde-GO em agosto de 2015. Os materiais vegetais foram identificados e uma amostra depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarin Neto sob os registros n° HJ 7521 e HJ 7522, respectivamente.

1.2.2. Extrações dos óleos essenciais

As folhas frescas foram reduzidas em moinho de facas e submetidas às extrações dos óleos essenciais pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo clewenger, pelo período de 2 horas a partir da ebulição.¹¹ Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação. Foram realizadas três lavagens do hidrolato com três porções de 10 mL de diclorometano. Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração até a realização dos ensaios biológicos.

1.2.3. Análises dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram diluídos em hexano e submetidos à análise em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-5000 da Shimadzu® com detector por espectrometria de massas (CG-EM). A análise foi realizada com coluna capilar de sílica fundida, modelo DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) da Shimadzu®, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo Split 1:20 foi realizada com injetor a 240 °C. A temperatura do detector foi de 270 °C e o forno de 60 a 180 °C a 3 °C/min. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 e V. Foram realizadas três repetições para os óleos essenciais analisados.

1.2.4. Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada através dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C₁₀-C₂₉) que foram coinjetados com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados das espectrotecas Wiley e Nist e da literatura.¹²

1.2.5. Atividade antibacteriana

As cepas testadas foram obtidas junto a *American Type Culture Collection* (ATCC, RockvilleMD, EUA). Os micro-organismos usados na avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foram: *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial foram determinados em triplicata pelo método de microdiluição, em microplacas com 96 poços (TPP, EUA).¹³ As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil; 8000 µg/mL), diluídas em caldo de soja tríptica (Difco,

Detroit, MI, EUA) para bactérias aeróbias e Schaedler Caldo (Difco), suplementado com hemina (5,0 µg/mL) e vitamina K (10,0 µg/mL) para as bactérias anaeróbias, com a finalidade de atingir concentrações variando de 400 a 12,5 µg/mL. A concentração de DMSO final foi de 4% (v/v), e esta solução foi usada como um controle negativo. O inóculo foi ajustado para cada organismo a fim de se obter uma concentração de células de 5×10^5 unidades formadoras de colônias por mL, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS).¹⁴ O dicloridrato de clorexidina (DCC, Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) foi utilizado como controle positivo, e as concentrações variaram de 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL. Foram realizados os controles de esterilidade dos caldos TSB e SCHAEDLER, esterilidade do dicloridrato de clorexidina, esterilidade da amostra, controle da cultura (inóculo) e o controle do DMSO. As microplacas (96 poços) com os micro-organismos aeróbios foram fechadas com um vedante de placa estéril e incubadas aerobicamente a 37 °C durante 24 horas. Os micro-organismos anaeróbios foram fechados com um vedante de placa estéril e incubados de 48 a 72 horas numa câmara anaeróbia (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido), a 37 °C, com 5 % a 10 % de H₂, 10 % de CO₂ e 80 % a 85 % de N₂. Logo depois, resazurina (Sigma, 30 µL) em solução aquosa (0,01 %) foi adicionada para indicar viabilidade de micro-organismos. Os valores de CIM foram determinados a partir da concentração mais baixa de óleo essencial, capaz de inibir o crescimento de micro-organismos.

1.2.6. Atividade tripanocida

Foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, constituída por formas tripomastigotas delgadas.¹⁵ Esta cepa vem sendo mantida no Biotério da Universidade de Franca, através de repiques sucessivos em camundongos Swiss, por punção cardíaca no dia do pico parasitêmico (7º dia da infecção). Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

O ensaio foi realizado utilizando sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7º dia da infecção). O sangue infectado foi diluído com solução fisiológica de forma a obter a concentração final de sangue com 10^6 formas tripomastigotas/mL.

As amostras dos óleos essenciais foram diluídas em DMSO e alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao sangue infectado na placa de microtitulação (96 poços), totalizando um volume de 200 μ L.

Para a realização do ensaio tripanocida, as amostras foram avaliadas em triplicata nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 μ g/mL. Como controles foram utilizados: (1) Controle positivo: benzonidazol; (2) Controle negativo: 0,5% de DMSO.

A microplaca foi incubada a 4°C por 24 horas, sendo que após este período, a atividade foi verificada quantitativamente, através da contagem das formas tripomastigotas, de acordo com a técnica já descrita na literatura¹⁶ e a determinação da porcentagem de lise parasitária foi realizada através da comparação com o grupo de controle sem tratamento.

1.2.7. Atividade citotóxica

Fibroblastos da linhagem LLCMK₂ foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-Gibco) 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (100 mL de soro) com 2,5 mL de estreptomicina e 2,5 mL de penicilina, em garrafas de cultura a 37°C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%. O meio de cultura com as células foi transferido para um tubo fálcon estéril e centrifugado (1500 rpm a 4°C por 15 minutos). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e 1 mL de RPMI foi acrescentado para atingir a concentração final de 10⁶ fibroblastos da linhagem LLCMK₂/mL. Foi realizado um novo cultivo por 24 horas em estufa de CO₂, e em seguida foi feita a leitura das placas em leitor de ELISA a 517 nm, através da técnica colorimétrica pelo MTT. Para a realização do ensaio de citotoxicidade, as amostras foram avaliadas nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL em triplicata. Como controle positivo foi utilizado DMSO 25% (Sigma[®]) e controle negativo DMSO (Sigma[®]) a 0,5%. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como concentração citotóxica 50% (CC₅₀), calculada pela estatística sigmoide, método de curva de concentração-resposta utilizando o *GraphPad Prism* (GraphPad Software Corporation, versão 5.0).

1.2.8. Atividade leishmanicida

Para avaliação da atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 164 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, cerca de 1×10^6 parasitos foram distribuídos em placas de 96 poços e os óleos essenciais foram previamente dissolvidos em DMSO (Synth) e adicionados às culturas nas concentrações de 3,12 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Anfotericina B foi adicionada nas culturas nas concentrações de 0,19 a 3,12 $\mu\text{g/mL}$. As culturas foram incubadas a 25°C em estufa BOD (Quimis) por 24 horas e a atividade leishmanicida foi determinada pela inibição do crescimento das formas promastigotas pela contagem em câmara de Neubauer (Global Glass – Porto Alegre, BR) do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1 % de DMSO (Synth) e como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (Eurofarma – São Paulo, BR) na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de lise em relação ao controle negativo (0,1% DMSO). Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50% (CI_{50}) foram determinados por meio de curvas de regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (*GraphPad* software, USA).

1.3.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus latifolia* e *Citrus limonia* forneceram rendimentos de 0,8% e 0,5%, respectivamente. Por CG-EM foram identificados 17 constituintes químicos no óleo essencial de *C. latifolia* (total de 82,2%) e 18 constituintes químicos para *C. limonia* (total de 91,9%). Os componentes identificados, índices de retenção e porcentagem relativa (%) estão apresentados na Tabela 1. Os componentes majoritários foram limoneno (**1**) (46,3%), nerol (**2**) (10,0%) e 1,8-cineol (**3**) (13,4%) (Figura 3).

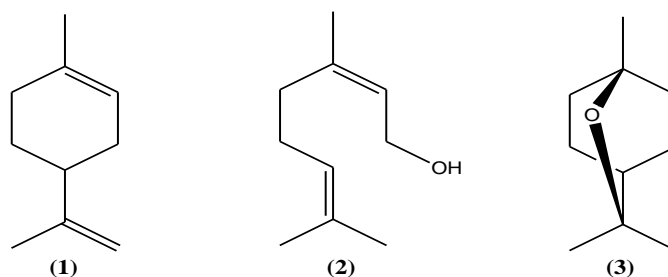


Figura 3: Estruturas químicas dos três constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia*. (1) Limoneno, (2) Nerol e (3) 1,8-Cineol

Tabela 1: Composição química dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus latifolia* e *Citrus limonia*.

Compostos	IR		Área (%)	
	Literatura	Calculado	<i>C. latifolia</i>	<i>C. limonia</i>
Hex-3-en-1-ol	859	852	0,8	-
Mirceno	990	977	-	0,8
Limoneno	1029	1028	46,3	40,0
Nerol	1361	1367	10,0	6,8
1,8-Cineol	1031	1030	4,1	13,4
(<i>trans</i>)-Óxido de limoneno	1142	1137	2,8	3,0
Óxido de cariofileno	1583	1586	2,4	6,9
Geraniol	1267	1274	2,2	3,4
Acetato de geranila	1381	1385	2,2	-
Carvona	1243	1246	1,9	-
Neral	1238	1243	1,9	3,9
β -Citronellol	1225	1230	1,8	-
Lonalool	1096	1100	1,2	2,9
(<i>cis</i>)-Óxido de limoneno	1136	1133	1,2	-
Citronellal	1153	1153	1,2	-
(<i>trans</i>)-Óxido de Linalool	1086	1088	0,7	-
(<i>cis</i>)-Óxido de Linalool (piranoide)	1074	1071	0,8	-
(<i>cis</i>)-Óxido de Linalool (furanoide)	1072	1073	-	1,2

α -Terpineol	1188	1191	0,7	-
<i>p</i> -Cimeno	1024	1024	-	0,7
Sabineno	1070	1067	-	0,3
Isopulegol	1159	1156	-	1,7
Pinocarvona	1164	1163	-	0,7
α -Terpineol	1188	1192	-	2,3
(<i>trans</i>)-Carveol	1216	1220	-	1,7
(4 <i>E</i>)-Decen-1-ol	1262	1260	-	1,0
Citronelal	1273	1276	-	1,2
Total (%)			82,2	91,9

IR: índice de retenção determinado em coluna DB-5

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* foi determinada com a finalidade de se verificar sua atividade frente a alguns micro-organismos anaeróbicos e aeróbicos orais (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito inibidor dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* frente a bactérias aeróbias e anaeróbias

	Micro-organismos	CIM	CIM	CIM
		<i>C. latifolia</i>	<i>C. limonia</i>	DCC
	<i>Streptococcus mutans</i> ^a (ATCC 25175)	100	200	0,922
	<i>S. mitis</i> ^a (ATCC 49456)	200	100	1,844
Aeróbios	<i>S. sanguinis</i> ^a (ATCC 10556)	100	400	0,922
	<i>S. sobrinus</i> ^a (ATCC 33478)	400	400	0,922
Anaeróbio	<i>Bacteroides fragilis</i> ^b (ATCC 25285)	400	400	0,737

^aBactéria gram-positiva; ^bBactéria gram-negativa; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) – $\mu\text{g/mL}$; **DCC:** Dicloridrato de clorexidina (controle positivo)

Os óleos essenciais estudados apresentaram moderada atividade inibitória frente a todas as bactérias testadas. É reportado na literatura¹⁷ que amostras que exibiram valores de CIM inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ tiveram atividade antibacteriana

considerada boa; de 100 a 500 µg/mL moderada; de 500 a 1000 µg/mL fraca e acima de 1000 µg/mL inativa.

Vários mecanismos são propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pela ação de óleos essenciais é devida ao dano direto causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, que afeta diretamente a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos. De acordo com a literatura, os efeitos inibitórios dos óleos essenciais são consistentes com a ação dos constituintes monoterpênicos e sesquiterpênicos na membrana celular, e o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos.¹⁸⁻²⁰

De acordo com a tabela 2, verificou-se atividade inibitória em menores concentrações contra as bactérias *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 49456 e *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556.

Streptococcus mitis, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus* são bactérias que apresentam patogenicidade frente ao esmalte dos dentes e tecido gengival estando diretamente ligadas a cárie e doenças periodontais. A placa bacteriana é definida como um biofilme de micro-organismos, contidos em matriz orgânica formada por substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro e por polímeros bacterianos.²¹

Os óleos essenciais avaliados apresentaram também moderada atividade frente à *Bacteroides fragilis*, um gênero bacteriano composto por bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios estritos. *B. fragilis* é considerado patógeno oportunista em humanos, com a capacidade de causar infecções na cavidade peritoneal e levar à formação de abscessos quando ocorre um trauma, por exemplo, no sítio de colonização. Em suma, é frequentemente associado a processos infecciosos, tais como bacteremias, infecções intra-abdominais, abscessos e infecções em tecidos moles.²²

Os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram ainda moderada atividade tripanocida quando testados frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Observou-se o aumento da lise das formas tripomastigota com o aumento da concentração dos óleos essenciais, com valores de CI₅₀ de 88,2 µg/mL para o óleo essencial de *C. limonia* e 51,7 µg/mL para o óleo essencial de *C. latifolia* em 24 horas. No entanto, o controle positivo benzonidazol apresentou valor de CI₅₀ = 9,8 µg/mL em 24 horas (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade tripanocida dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*.

OEs	% de lise±D.P./concentração (µg/mL)					
	200,0	100,0	50,0	25,0	12,5	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>C. latifolia</i>	44,8±4,1	45,5±3,1	12,9±3,5	4,7±5,1	1,3±5,0	51,7
<i>C. limonia</i>	53,0±6,1	34,6±2,0	49,6±5,1	0,6±1,1	0±0	88,2

OEs: óleos essenciais; D.P: desvio padrão

É reportado na literatura que amostras que exibiram (CI₅₀ < 10 µg/mL) tiveram atividade tripanocida considerada altamente ativa, ativa (CI₅₀ > 10 < 50 µg/mL), moderadamente ativa (CI₅₀ > 50 < 100 µg/mL) e inativa (CI₅₀ > 100 µg/mL).²³

A moderada atividade tripanocida observada para os óleos essenciais de *C. latifolia* e *C. limonia* pode ser atribuída aos componentes geranial e neral, que apesar de não serem os constituintes majoritários nos óleos essenciais avaliados é provável que eles estejam relacionados com os outros componentes através do comportamento sinérgico.²⁴

Este é o primeiro relato sobre a atividade tripanocida dos óleos essenciais das folhas de *C. latifolia* e *C. limonia* e apesar dos grandes avanços alcançados pela medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda são consideradas muito importantes no que diz respeito aos cuidados com a saúde.²⁵

A avaliação da citotoxicidade em fibroblastos, pelo método colorimétrico do MTT mostrou que os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram moderada citotoxicidade, com CC₅₀ = 422,9 µg/mL observado para o óleo essencial de *C. limonia* e CC₅₀ = 502,9 µg/mL para o óleo essencial de *C. latifolia* (Tabela 4), valores maiores que o controle positivo utilizado, o benzonidazol (CC₅₀ = 147,3 µg/mL). É descrito na literatura²⁴ que quanto menor o valor do CC₅₀, mais citotóxico é o composto avaliado frente à linhagem celular utilizada.

Tabela 4: Atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* sobre fibroblastos

OEs	% células viáveis±D.P./concentração (µg/mL)							
	6,25	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0	400,0	CC ₅₀
<i>C. limonia</i>	95,9±4,0	94,3±5,6	90,3±5,5	73,0±2,6	71,0±2,0	65,8±2,7	58,8±1,8	422,9
<i>C. latifolia</i>	100±0	100±0	100±0	100±0	85,5±4,6	74,8±2,8	62,9±3,4	502,9
Benzonidazol	147,3							

OEs: óleos essenciais; CC₅₀ (µg/mL); D.P: desvio padrão

Os óleos essenciais das folhas frescas de *C. limonia* e *C. latifolia* foram classificados como moderadamente citotóxicos ($CC_{50} > 100 < 1000 \mu\text{g/mL}$) em comparação com dados já descritos na literatura.²³ Esta moderada citotoxicidade dos óleos é um indicador de que a planta pode ser bem tolerada frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade destes óleos bioativos empregando outros modelos (*in vivo*) se fazem necessários.

Os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram promissora atividade leishmanicida quando testados frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Observou-se um aumento da lise dos parasitos também com o aumento da concentração dos óleos essenciais, apresentando valores de CI_{50} de 2,63 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *C. limonia* e CI_{50} de 2,03 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de *C. latifolia*, utilizando como padrão o anfotericina B ($CI_{50} = 0,60 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas frescas de *C. latifolia* e *C. limonia* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

OEs	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) \pm Desvio Padrão					CI_{50}
	50,00	25,00	12,50	6,25	3,12	
<i>C. latifolia</i>	87,17 \pm 3,60	78,67 \pm 1,51	75,21 \pm 8,11	64,26 \pm 2,60	55,46 \pm 3,02	2,03
<i>C. limonia</i>	100,00	85,15 \pm 7,13	70,16 \pm 1,55	62,53 \pm 2,13	58,06 \pm 1,29	2,63

OEs: óleos essenciais; CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)

O potencial leishmanicida de óleos essenciais tem sido bastante estudado²⁶ e os óleos essenciais das duas espécies de *Citrus* apresentaram satisfatório efeito leishmanicida e esta atividade pode estar relacionada à presença do componente químico geraniol, que já foi avaliado frente a *L. infantum* apresentando atividade antiparasitária significativa.²⁷ O limoneno, constituinte majoritário no óleo essencial das folhas de *C. latifolia* (46,3%) e *C. limonia* (40,0%), também é digno de menção, visto que suas atividades antitumoral, antibiótica e principalmente antileishmania já foram comprovadas biologicamente.²⁸

1.4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* apresentaram em sua composição química uma mistura de mono e sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários

foram o limoneno (46,3 %), nerol (10,0 %) e 1,8-cineol (13,4 %). Em adição, quando os óleos essenciais foram testados biologicamente, estes demonstraram moderada atividade antibacteriana e tripanocida e promissora atividade leishmanicida, além de apresentarem moderadamente tóxico para as células LLCMK₂. Esses resultados indicam que moléculas bioativas presentes nos óleos essenciais das folhas frescas destas duas espécies de *Citrus* ocorrentes no sudoeste goiano podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas com atividade antimicrobiana, tripanocida e leishmanicida.

1.5. AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq, FAPEG e IFgoiano, pelo apoio financeiro.

1.6. REFERÊNCIAS

1. Severino, V. G. P.; Monteiro, A F.; da Silva, M. F. G.; Lucarini, R.; Martins, C. H. G. Chemical study of *Hortia superba* (Rutaceae) and investigation of the antimycobacterial activity of crude extracts and constituents isolated from *Hortia* species. *Química Nova* **2015**, *38*, 42. [CrossRef]
2. Campelo, L. M. L.; Sá, C. G.; Feitosa, C. M.; Sousa, G. F.; Freitas, R. M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2013**, *15*, 708. [CrossRef]
3. Bizzo, H. R.; Hovell, A. M. C.; Rezende, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova* **2009**, *32*, 588. [CrossRef]
4. Rehman, S-U.; Hussain, S.; Nawaz, H.; Mushtaq, A. M.; Murtaza, M. A.; Rizvi, A. J. Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistan Journal of Nutrition* **2007**, *6*, 558. [CrossRef]
5. Mendonça, L. M. V. L.; Conceição, A.; Piedade, J.; Carvalho, V. D.; Theodoro, V. C. A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 870. [CrossRef]

6. Reda, S. Y.; Leal, E. S.; Batista, E. A. C.; Barana, A. C.; Schnitzel, E.; Carneiro, P. I. B. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2005**, *25*, 672. [[CrossRef](#)]
7. Sousa, R. M. F.; de Moraes, S. A. L.; Vieira, R. B. K.; Napolitano, D. R.; Guzman, V. B.; Moraes, T. S.; Cunha, L. C. S.; Martins, C. H. G.; Chang, R.; Aquino, F. J. T.; Nascimento, E. A.; Oliveira, A. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. Leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products* **2015**, *65*, 71. [[CrossRef](#)]
8. Hotez, P. J.; Pecoult, B.; Rijal, S.; Boehme, C.; Aksoy, S.; Malecela, M.; Tapia-Conyer, R.; Reeder, J. C. Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2016**, *10*, e0003895. [[CrossRef](#)]
9. Ferreira, E. I. Planejamento de fármacos na área de doença de chagas: avanços e desafios. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 225. [[CrossRef](#)]
10. Bezerra, J. L.; Costa, G. C.; Lopes, T. C.; Carvalho, I. C. D. S.; Patrício, F. J.; Sousa, S. M.; Amaral, F. M. M.; Rebelo, J. M. M.; Guerra, R. N. M.; Ribeiro, M. N. S.; Nascimento, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 631. [[CrossRef](#)]
11. Siqueira, C. A. T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C. L.; Moreno, P. R. H.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Fischer, D. C. H. Chemical constituents of the volatil oil from leaves of *Annona coriácea* and *in vitro* antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 33. [[CrossRef](#)]
12. Adams, R. P.; *Identification of essential oil componentes by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy*, Allured: Card Stream I L, 2001.
13. Rios, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 6^a ed. NCCLS document M7-A6. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
15. Nussenzweig, V.; Klotzel, J. K.; Sonntag, R.; Biancalana, A.; Freitas, J. L. P.; A Neto, V.; Kloetzel, J. K. Ação de corantes trifetil-metânicos sobre o *Trypanosoma*

- Cruzi in vitro*. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. *Hospital* **1953**, *44*, 731. [PubMed]
16. Brenner, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1962, *4*, 389. [PubMed]
17. Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Dias, F. B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027. [CrossRef] [PubMed]
18. Ayres, M. C. C.; Brandão, M. S.; Vieira-Júnior, G. M.; Menor, J. C. A. S.; Silva, H. B.; Soares, M. J. S.; Chaves, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 90. [CrossRef]
19. Oyedemi, S. O.; Okoh, A. I.; Mabinya, L. V.; Pirochenva, G.; Afolayan, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* **2009**, *8*, 1280. [CrossRef]
20. Rahman, A.; Kang, S. C. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil extracts of *Erigeron ramosus* (WALT.). *Journal Food Safety* **2009**, *29*, 176. [CrossRef]
21. Pereira, J. V.; Pereira, M. S. V.; Sampaio, F. C.; Sampaio, M. C. C.; Alves, P. M.; Araújo, C. R. F.; Higinio, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre micorganismos do biofilme dental. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 88. [CrossRef]
22. Nakano, V.; Avila-Campus, M. J. Virulence Markers and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria of the *Bacteroides fragilis* Group Isolated from Stool of Children with Diarrhea in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2004**, *99*, 307. [CrossRef] [PubMed]
23. Alves, R. T.; Regasini, L. O.; Funari, C. S.; Young, M. C. M.; Rimoldi, A.; Bolzani, V. S.; Silva, D. H. S.; Albuquerque, S.; Rosa, J. A. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22*, 528. [CrossRef]

24. Andrade, M.A.; Tese de doutorado, Universidade Federal de Lavras, 2013. [\[Link\]](#)
25. Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2000**, *33*, 179. [\[CrossRef\]](#)
26. Micheletti, A. C.; Beatriz, A. Progressos Recentes na Pesquisa de Compostos Orgânicos com Potencial Atividade Leishmanicida. *Revista Virtual de Química* **2012**, *4*, 268. [\[CrossRef\]](#)
27. Carneiro, J. N. P.; Albuquerque, R. S.; Leite, N. F.; Machado, A. J. T.; Brito, D. I. V.; Rolón, M.; Veja, C.; Coronel, C.; Coutinho, H. D. M.; Moraes-Braga, M. F. B. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Cadernos de Cultura e Ciência* **2015**, *13*, 29. [\[CrossRef\]](#)
28. Arruda, D. C.; Miguel, D. C.; Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Katzin, A. M.; Uliana, S. R. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2009, *63*, 643. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

CAPÍTULO II - Atividade tripanocida *in vitro* e composição química do óleo essencial dos frutos verdes de *Protium ovatum* (BURSERACEAE)

(Normas da Revista Brasileira de Fruticultura- Artigo Submetido)

RESUMO

A doença de Chagas é uma das principais doenças tropicais negligenciadas causadas pelo *Trypanosoma cruzi* e em seu tratamento utilizam medicamentos como o nifurtimox e o benzonidazol, que causam vários efeitos colaterais. O mercado de produtos naturais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e o uso das plantas continua sendo uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos para cura de doenças. Portanto, este estudo aborda a composição química do óleo essencial dos frutos verdes de *Protium ovatum* e a avaliação de seus potenciais tripanocida e citotóxico. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação utilizando aparelho tipo cleveger. A composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Os principais compostos encontrados no óleo essencial dos frutos verdes de *P. ovatum* foram β -mirceno (62,0 %), α -pineno (11,3 %) e limoneno (7,3 %). Este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial obtido a partir de frutos verdes de *P. ovatum*. Os resultados mostraram que o óleo essencial analisado apresenta forte atividade tripanocida contra as formas tripomastigota da cepa Y do *T. cruzi* ($IC_{50} = 1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O óleo essencial exibiu ainda moderada citotoxicidade frente a fibroblastos da linhagem LLCMK₂ na concentração avaliada ($CC_{50} = 550,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em suma, o óleo essencial dos frutos verdes de *P. ovatum* pode ser

considerado excelente fonte alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários.

Termos para indexação: *Protium ovatum*, Burseraceae, frutos, óleo essencial, *Trypanosoma cruzi*, análise citotóxica.

CHAPTER II - *IN VITRO* ANTIPARASITIC ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL FROM GREEN FRUITS OF *Protium ovatum* (BURSERACEAE)

(Norms of the Brazilian Journal of Fruticulture- Article Submitted)

ABSTRACT

Chagas disease is a major neglected tropical disease caused by *Trypanosoma cruzi*. It has been treated with the antiparasitic drugs nifurtimox and benznidazole, which cause several side effects. The market for natural products has considerably grown lately and the use of plants has become an alternative to the development of new drugs to cure the disease. Therefore, this study aimed at describing the chemical analysis of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* and evaluating their trypanocidal and cytotoxic potential. The essential oil was obtained by cleveger hydrodistillation whereas its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The major compounds found in the essential oil from green fruits of *P. ovatum* were β -myrcene (62.0 %), α -pinene (11.3 %) and limonene (7.3 %). To the best of our knowledge, this was the first time that the chemical composition of the essential oil from green fruits of *P. ovatum* was described. Results showed that the essential oil had strong trypanocidal activity against trypomastigote forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 1.2 \mu\text{g/mL}$). In addition, the essential oil from green fruits of *P. ovatum* did not display cytotoxicity against fibroblast cells at the concentration range under analysis ($CC_{50} = 550.3 \mu\text{g/mL}$). As a result, it is an excellent option for the development of new antiparasitic drugs.

Index terms: *Protium ovatum*, Burseraceae, fruits, essential oil, *Trypanosoma cruzi*, cytotoxic analysis.

2.1. INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, é uma doença tropical negligenciada e endêmica na América Latina. A organização mundial da saúde estima que cerca de 6-7 milhões de latino-americanos foram infectados com *Trypanosoma cruzi*, uma vez que essa doença foi encontrada principalmente em áreas endêmicas de países da América Latina (PAULA et al., 2015).

A doença tem sido tratada com fármacos que apresentam elevada toxicidade para o corpo hospedeiro ou baixa eficiência contra o patógeno (IZUMI et al., 2012). Até o momento, nenhuma vacina foi desenvolvida para a doença de Chagas e o tratamento atual é conduzido com nifutimox (Nf) e benzonidazol (Bz). No entanto, ambos são bastante tóxicos e com efeito limitado sobre a fase crônica da doença e também sobre diferentes tipos de parasitas isolados, nota-se, dessa forma a importância em desenvolver novos fármacos para o tratamento da doença ocasionada por estes parasitas (SOEIRO; CASTRO, 2011).

O Cerrado, um patrimônio natural, destaca-se pela sua biodiversidade em espécies vegetais e deste modo tem sido considerado fonte importante de novas substâncias naturais com diferentes atividades biológicas (SILVA et al., 2015). O uso dos produtos naturais, tais como extratos, compostos isolados e óleos essenciais, têm-se tornado uma alternativa para desenvolvimento de novos fármacos, fato que se deve ao grande potencial desses compostos para o tratamento de várias doenças, incluindo a Doença de Chagas (AFFONSO et al., 2012; LEITE et al., 2010).

Neste contexto, os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas apresentam várias atividades biológicas, como por exemplo, antibacterianas, anticancerígenas, anti-inflamatória, antimutagênica, antifúngicas, antioxidantes e antiprotozoárias. Nos últimos anos, os óleos essenciais têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores, em virtude das quantidades de compostos bioativos encontrados nestes óleos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A família Burseraceae compreende 21 gêneros com aproximadamente 600 espécies, sendo descrito na literatura que as espécies dessa família geralmente são usadas para tratar feridas e úlceras, além disso, atuam como anti-inflamatórios e repelentes. Esta família é representada principalmente pelo gênero *Protium*, que se

destaca com 135 espécies. É reportado na literatura que espécies do gênero *Protium* possuem uma mistura de triterpenos, mono e sesquiterpenos e são bastante conhecidos por suas propriedades biológicas significativas como, por exemplo, atividades acaricida e anti-inflamatória (MORAES et al., 2013).

Protium ovatum é uma planta herbácea encontrada no Cerrado brasileiro, as propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivos, imunoestimulantes e anticancerígenas de suas resinas já foram relatadas em vários estudos (SIANI et al., 2011). No entanto, trabalhos anteriores não descreveram nem a composição química, nem o potencial tripanocida e a citotoxicidade do óleo essencial da espécie *P. ovatum*. Desta forma, este estudo tem como objetivo descrever pela primeira vez a composição química do óleo essencial de frutos verde de *P. ovatum* e sua atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* e atividade citotóxica contra células de fibroblastos de mamíferos LLCMK2.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Os frutos verdes de *P. ovatum* foram coletados na região do Cerrado da Universidade de Rio Verde (UniRV), no município de Rio Verde, no estado de Goiás, Brasil, em setembro de 2015. A planta foi identificada pela bióloga Erika Virgínia Estefâne de Jesus Amaral (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, GO) e uma amostra foi depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto com exsicata de nº HJ 7420.

2.2.2. Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído de frutos verdes de *P. ovatum* (100 g) que foram submetidos à extração em aparelho tipo Clevenger a temperatura de 100 °C durante 2 horas (Millezi et al. 2013). O experimento foi realizado em triplicata e o rendimento total de óleo foi expresso como valor percentual ($\text{g} \cdot 100^{-1}$ g de material vegetal fresco). As amostras do óleo essencial foram armazenadas a -5°C até posteriores ensaios químico e biológico.

2.2.3. Análise do óleo essencial por CG-EM

A análise por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) foi realizada por um Shimadzu QP2010 com um autoinjector AOC-20i e uma coluna DB-5MS (30 mx 0,25 mm, 0,25 mm de espessura). O gás transportador era He com pressão de 57,4 kPa e taxa de fluxo de 1,00 mL.min⁻¹. A razão de divisão era de 1.30⁻¹, a temperatura do injetor era de 250 ° C e o volume injetado era de 1 µL. A programação da temperatura foi: 60 - 240 ° C, aumentando 3 ° C.min⁻¹. MS foram registradas no modo de ionização eletrônica (EI), com energia de ionização de 70 eV (tempo de varredura: 2 scans. S⁻¹). A identificação dos constituintes baseou-se nos índices de retenção (o cálculo utilizado de alcanos C₉ a C₂₂) e por comparação dos espectros de massa com as bibliotecas (Wiley 7 e Nist 62) e referências a dados previamente publicados (ADAMS, 2007).

2.2.4. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro*

O ensaio tripanocida *in vitro* foi realizado utilizando a cepa Y de *T. cruzi* constituídas por formas tripomastigotas delgadas. Esta cepa vem sendo mantida no Biotério da Universidade de Franca, através de repiques sucessivos em camundongos Swiss, por punção cardíaca no dia do pico parasitêmico (7º dia da infecção). Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

O ensaio foi realizado utilizando sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7º dia da infecção). O sangue infectado foi diluído com solução fisiológica de forma a se obter a concentração final de sangue com 10⁶ formas tripomastigotas.mL⁻¹. As amostras dos óleos essenciais foram diluídas em DMSO e alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao sangue infectado na placa de microtitulação (96 poços), totalizando um volume de 200 µL. Para a realização do ensaio tripanocida, as amostras foram avaliadas em triplicata nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg.mL⁻¹. Como controles foram utilizados: (1) Controle positivo: benzonidazol; (2) Controle negativo: 0,5 % de DMSO. A microplaca foi incubada a 4° C por 24 horas, sendo que após este período, a atividade foi verificada quantitativamente, através da contagem das formas tripomastigotas, de

acordo com a técnica empregada por Brenner (1962) e a determinação da porcentagem de lise parasitária foi realizada através da comparação com o grupo de controle sem tratamento. Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50 % (CI₅₀) foram determinados por meio de curvas de regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, USA).

2.2.5. Avaliação da atividade citotóxica

As células de fibroblasto LLCMK2 foram crescidas em meio RPMI 1640 suplementado com 100 U. mL⁻¹ de penicilina, 100 µg . mL⁻¹ de estreptomicina e 5 % de soro de vitelo fetal inativado. Mantiveram-se a 37° C em 5 % de CO₂. Uma suspensão de células foi semeada na concentração de 1 .10⁶ células. mL⁻¹ numa microplaca de 96 poços com meio RPMI 1640. Em seguida, as células foram tratadas com óleo essencial a diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg . mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24 h e a atividade biológica foi avaliada pelo método colorimétrico MTT [MTT; Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] num leitor de microplacas a 540 nm. O meio RPMI 1640 foi o controle positivo enquanto os meios DMSO e RPMI 1640 foram os negativos. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela seguinte fórmula: % de viabilidade celular = 1 - [(Y-N) / (N-P)] x 100, em que Y = absorvência de poços contendo células e óleo essencial em diferentes concentrações; N = controlo negativo; E P = controle positivo (ESPERANDIM et al., 2013).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrodestilação dos frutos verde de *P. ovatum* forneceu um rendimento de 0,5 % e um óleo essencial incolor, com odor forte e característico. Na Tabela 1, estão apresentados os 13 compostos identificados, com concentrações superiores a 0,1 %, representando 95 % da composição química total do óleo, caracterizada pela predominância de terpenos: β- pineno (5,5 %), sabineno (5,0 %), p- cimeno (0,2 %), α- copaeno (0,3 %), E- cariofileno (2,0 %) e α- humuleno (0,2 %), pirileno (0,4 %), pinocarvona (0,3 %). Os componentes majoritários foram: β- mirceno (62,0 %), α- pineno (11,3 %) e o limoneno (7,3 %). Os componentes identificados, índices de retenção e porcentagem relativa (%) estão apresentados na Tabela 1.

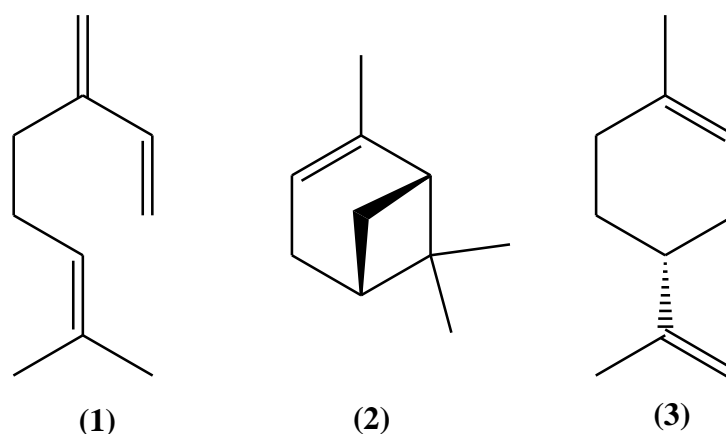


Figura 1: Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial de frutos verdes *P. ovatum*: (1) β -mirceno; (2) α -pineno e (3) limoneno.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum*.

Compostos	RI ^a	RI ^b	Área %
β -Pineno	970	969	5,5
Sabineno	971	972	5,0
α -Pineno	928	930	11,3
β -Mirceno	987	991	62,0
<i>p</i> -Cimeno	1025	1024	0,3
Limoneno	1028	1028	7,3
Pirileno	1103	1102	0,4
Pinocarvona	1164	1163	0,2
Terpinen-4-ol	1173	1178	0,2
Borneol	1165	1165	0,2
α -Copaeno	1375	1376	0,3
<i>E</i> -cariofileno	1420	1420	2,0
α -Humuleno	1451	1453	0,3
Total			95,0

RI^a: Índices de retenção linear encontrados na literatura. **RI^b:** Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos da série de *n*-alcanos numa coluna capilar DB-5 de 30 m.

O β -mirceno, o α -pineno e o limoneno (Figura 1) são os três componentes majoritários do óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum*, e é relatado na literatura a

presença destes constituintes em óleos essenciais de outras espécies do mesmo gênero (Zoghbi et al., 2005). No estudo desenvolvido por Castelo et al. (2010), o óleo essencial das folhas de *P. ovatum*, forneceu o rendimento de 0,10 %, e a mistura complexa de constituintes terpênicos que foram determinada por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e IV. Outras espécies de *Protium* quando analisadas apresentaram uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais de resinas, ramos e folhas (Carvalho et al., 2010).

O óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum* apresentou uma expressiva atividade tripanocida quando testados frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Observou-se aumento da inviabilidade das células tripomastigotas com aumento da concentração de óleo essencial, com valores de $\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ sendo mais baixo que o valor do controle positivo com benzonidazol, $\text{IC}_{50} = 9,8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade tripanocida do óleo essencial de frutos verdes de *Protium ovatum* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*

O E	% de lise±D.P./concentração ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)					
	200	100	50	25	12.5	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>P. ovatum</i>	77,2±5.8	81,6±4.9	88,4±1.0	91,0±0.4	97,6±0.4	1.2

EO: óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum*. **D.P:** desvio padrão

A literatura relatou que as amostras com atividade tripanocida de $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ são consideradas altamente ativas, $\text{IC}_{50} > 50 < 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ moderadamente ativas e $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e inativas (Alves et al. 2012).

As propriedades tripanocidas dos componentes majoritários do óleo essencial de frutos verdes *P. ovatum* já foram descritas anteriormente (Santos et al., 2014, Sartorelli Et al., 2012, Zeng et al., 2010). É proposto que a atividade dos óleos essenciais contra os tripanossomatídeos se deve principalmente a composição terpênic. Os terpenos são responsáveis pelo caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, permitindo sua difusão através da membrana celular do parasita e afetando as vias metabólicas e organelas intracelulares (Borges et al., 2012).

Este é o primeiro relato da atividade tripanocida do óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum* e apesar dos grandes avanços da medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda são consideradas muito importantes em relação à saúde (Calixto, 2000). Vários estudos de óleos essenciais mostraram que algumas plantas

exibem atividade tripanocida contra *T. cruzi* (Baldissera et al., 2013, Escobar et al., 2010).

As culturas de células de fibroblasto de mamífero LLCMK2 foram tratadas com óleo essencial a concentrações de 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100; 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 24 h. Os resultados mostraram que o essencial de frutos verdes de *P. ovatum* não apresentou toxicidade na concentração avaliada com CC_{50} 550,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, comparativamente ao controle positivo de benzonidazol com CC_{50} 147,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade citotóxica do óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum*

EO	% de viabilidade \pm D.P./concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							CC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	
<i>P. ovatum</i>	64,3 \pm 2.3	85,7 \pm 1.4	90,2 \pm 5.0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	550,3

EO: óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum*. D.P: desvio padrão

É importante salientar que o óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum* não apresentou citotoxicidade contra as células fibroblásticas na faixa de concentração em análise (Magalhães et al., 2012). Há evidências de que, por causa da solubilidade lipídica, os óleos essenciais têm baixa densidade e rápida difusão através das membranas celulares. Como resultado, eles poderiam danificar a estrutura da membrana celular do parasita e levar à lise celular (Anthony et al., 2005). Além disso, podem haver efeitos sinérgicos e / ou aditivos entre os constituintes dos óleos essenciais (Melo et al., 2011).

2.4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que o óleo essencial de frutos verdes *P. ovatum* encontrado no cerrado brasileiro, localizado na região Centro-Oeste do país, possui alta atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* e moderada citotoxicidade em relação às células LLCMK2. A alta concentração de β -mirceno (62,0 %) no óleo essencial de frutos verdes investigados torna o fruto desta espécie uma nova fonte

produtora deste metabolito secundário que futuramente pode servir como matéria-prima na síntese de novos medicamentos. Outros estudos utilizando experimentos *in vivo* devem ser realizados para determinar de maneira mais completa sua eficiência. Em suma, esta foi a primeira vez que se descreveu a composição química do óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum* e suas atividades biológicas *in vitro*, destacando a importância deste trabalho para o conhecimento desta espécie botânica.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS R.P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.

AFFONSO, R.S.; RENNÓ, M.N.; SLANA, G.B.C.A.; FRANÇA, T.C.C. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 4, n.02, p. 146-161, 2012.

ALVES, R.T.; REGASINI, L.O.; FUNARI, C.S.; YOUNG, M.C.M.; RIMOLDI, A.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; ALBUQUERQUE, S.; ROSA, J.A. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.22, p. 528-533. 2012.

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitology**, Cambridge, v.21, n.10, p. 462-468, 2005.

BALDISSERA, M.D.; SILVA, A.S.; OLIVEIRA, C.B.; ZIMMERMANN, C.E.P.; VAUCHER, R.A.; SANTOS, R.C.V.; RECH, V.C.; TONIN, A.A.; GIONGO, J.L.; MATOS, C.B.; KOESTER, L.; SANTURIO, J.M.; MONTEIRO, S.G. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: *in vitro* tests. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v.134, n.03, p. 356-361, 2013.

BORGES, A.R.; AIRES, J.R.A.; HIGINO, T.M.M.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v.132, p.123-128, 2012.

BRENNER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.4, p. 389-396, 1962.

CASTELO, A.V.M.; MENEZZI, C.H.S.D.; RESCK, I.S. 2010. Yield and spectroscopic analysis (^1H , ^{13}C NMR; IR) of essential oils from four plants of the Brazilian Savannah. **Cerne**, Lavras v.16, n.04, p.573-584, 2010.

CARVALHO, L.E.; MAGALHÃES, L.A.M.; LIMA, M.P.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R. Essential oils of *Protium* of the Adolpho Ducke forest reserve: *Protium crassipetalum*, *P. heptaphyllum* subs. *ulei*, *P. pilosissimum* and *P. polybotryum*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.16, n.04, p.551-554,2013.

CARVALHO, L.E.; PINTO, D.S.; MAGALHÃES, L.A.M.; LIMA, M.P.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R. 2010. Chemical constituents of essential oil of *Protium decandrum* (Burseraceae) from western Amazon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.13,n.02,p. 181-184,2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n.02, p.179-189,2000.

ESPERANDIM, V.R.; FERREIRA, D.S.; RESENDE, K.C.S.; MAGALHÃES, L.G.; SOUZA, J.M.; PAULETTI, P.M.; JANUÁRIO, P.M.; LAURENTZ, R.S.; BASTOS, J.K.; SÍMARO, G.V.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A. *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of *Piper cubeba*. **Planta Medica**, New York U.A.E, v.79, p.1653-1655,2013.

ESCOBAR, P.; LEAL, S.M.; HERRERA, L.V.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, p.184-190,2010.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. 2012. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington U.A.E, v.55, n.07, p. 2994-3001,2012.

LEITE, A.C.; NETO, A.P.; AMBROZIN, A.R.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F.; ALBUQUERQUE. S.Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n.01, p. 1-6, 2010.

MAGALHÃES, L.G.; SOUZA, J.M.; WAKABAYASHI, K.A.L.; LAURENTIZ, R.; VINHÓLIS, A.H.C.; REZENDE, K.C.S.; SIMARO, G.V.; BASTOS, J.K.; RODRIGUES, V.; ESPERANDIM, V.R.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Los Angeles U.A.E, v.110, n.05 p.1747-1754,2012.

MELO, N.I.; MAGALHÃES, L.G.; CARVALHO, C.E.; WAKABAYASHI, K.A.L.; AGUIAR, G.P.; RAMOS, R.C.; MANTOVANI, A.L.L.; TURATTI, I.C.C.; RODRIGUES, V. GROppo M, CUNHA WR, VENEZIANI RCS, CROTTI AEM. 2011. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Molecules**, Switzerland, V.16, n.01, p.762-773, 2011.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICOLLI, R. H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, V. 15, n.03, 2013.

MORAES MM, CAMARA CAG, RAMOS CS. Seasonal variation in the essential oil of *Protium bahianum* Daly (Burseraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.16, p. 300-307,2013.

PAULA JC, DESOTI VC, SAMPIRON EG, MARTINS SC, UEDA-NAKAMURA T, RIBEIRO SM, BIANCO EM, SILVA SO, OLIVEIRA GG, NAKAMURA CV. Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.25, n. 06 p. 651-656, 2015.

PINTO DS, CARVALHO LE, LIMA MP, MARQUES MOM, FACANALI R, RIBEIRO JELS. Volatiles of foliar rachis, branches and resin elicited by insects from *Protium hebetatum* grows wild in Amazon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.13, p.699-703,2010.

RAUT JS, KARUPPAYIL SW. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, Constança Romênia v.62, p.250-264,2014.

SARTORELLI P, SANTANA JS, GUADAGNIN RC, LAGO JHG, PINTO EG, TEMPONE AG, STEFANI HA, SOARES MG, SILVA AM. *In vitro* trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quimica Nova**, São Paulo, v.35, p.743-747, 2012.

SANTOS NN, MENEZES LR, DOS SANTOS JA, MEIRA CS, GUIMARHES ET, SOARES MB, NEPEL A, BARISONE A, COSTA EV. A new source of (R)-limonene and rotundifolone from leaves of *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) and their trypanocidal properties. **Natural Product Communications**, Westerville ,v.9, p.737-739,2014.

SILVA AF, RABELO MFR, ENOQUE MM. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p.1016-1030,2015.

SIANI AC, RAMOS MF, MONTEIRO SS, DOS SANTOS RR, SOARES ROA. Essential oils of the oleoresins from *Protium heptaphyllum* growing in the Brazilian southeastern and their cytotoxicity to neoplastic cell lines. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.14, p. 373-378, 2011.

SOEIRO MNC, CASTRO SL. 2011. Screening of potential anti-*Trypanosoma Cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. **Opening Medicinal Chemistry Journal**, Sharjah, U.A.E, v.5, p. 21-30,2011.

ZENG QI, JIN HZ, QIN JJ, FU JJ, HU XJ, LIU JH, YAN L, CHEN M, ZHANG WD. Chemical constituents of plants from the genus *Dracocephalum*. **Chemistry Biodiversity**, Zurich Switzerland, v.7, p.1911-1929,2010.

ZOGHBI MGB, ANDRADE EHA, LIMA MP, SILVA TMD, DALY DC. 2005. The essential oils of five species of *Protium* growing in the North of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Abingdon U.A.E, v.8,p. 312-317,2005.

CAPÍTULO III - ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VITRO* E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *PROTIUM OVATUM*

(Normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências)

RESUMO

As leishmanioses e tripanossomíases são doenças parasitárias globalmente difundidas e com elevado índice de mortalidade. Os fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças são altamente tóxicos, fato que dificulta a adesão terapêutica. Deste modo a busca por novas drogas mais eficazes e seguras para o tratamento destas doenças são necessárias. Os produtos naturais têm se destacado como alternativa na procura por novas moléculas bioativas com potencial terapêutico. Neste estudo foi avaliada a composição química e atividade antiparasitária do óleo essencial das folhas de *Protium ovatum* contra as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* e as formas promastigotas do *Leishmania amazonensis*. O óleo essencial em estudo apresentou altamente ativo frente às formas tripomastigotas do *T. cruzi* ($IC_{50} = 5,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e promastigotas do *L. amazonensis* ($IC_{50} = 1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Por CG-EM, foram identificados 18 constituintes químicos no óleo essencial, sendo o espatulenol (17,6 %), óxido de cariofileno (16,4 %), *E*-cariofileno (14,0 %) e o mirceno (8,4 %) como componentes majoritários. Este é o primeiro relato da composição química e das atividades *anti-Trypanosoma* e *anti-Leishmania* do óleo essencial de *Protium ovatum*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, óleo essencial, *Protium ovatum*, doenças parasitárias.

CHAPTER III – *In vitro* Antiparasitary activity and chemical composition of the essential oil of the leaves of *Protium ovatum*.

(Norms of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences)

ABSTRACT

Leishmaniasis and *trypanosomiasis* are globally widespread parasitic diseases with a high mortality rate. The drugs available for the treatment of these diseases are highly toxic, a fact that makes therapeutic adherence difficult. In this way it is necessary the search for new drugs more effective and safe for the treatment of these diseases are necessary. Natural products have stood out as an alternative in the search for new bioactive molecules with therapeutic potential. In this study the chemical composition and antiparasitic activity of the essential oil of the leaves of *Protium ovatum* against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and the promastigote forms of *Leishmania amazonensis* were evaluated. The essential oil in the study was highly active against trypomastigote forms of *T. cruzi* (IC₅₀ = 5.4 µg.mL⁻¹) and *L. amazonensis* promastigotes (IC₅₀ = 1.56 µg.mL⁻¹). According to CG-EM, 18 chemical constituents were identified in the essential oil: spatulenol (17.6%), caryophyllene oxide (16.4%), E-caryophyllene (14.0%) and mircene (8.4%) as major components. This is the first report of the chemical composition and the anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* activities of the essential oil of *Protium ovatum*.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, essential oil, *Protium ovatum*, parasitic diseases.

3.1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, e abriga a mais rica flora, detendo cerca de 5 % da biodiversidade do planeta. É considerado como fonte de um imenso potencial de uso econômico, em que os componentes da biodiversidade podem fornecer ampla gama de produtos naturais (Rodrigues e Barbosa. 2012). O uso destes produtos é registrado na história humana desde os tempos antigos e o homem tem demonstrado conhecimento e sabedoria quanto à utilização e aplicação destes produtos (Estevam et al. 2016).

A resistência dos micro-organismos patogênicos contra os tratamentos atuais é um problema crescente de saúde pública em todo o mundo. Neste contexto, a busca por remédios advindos de produtos naturais tem chamado a atenção pela resistência aos antibióticos tradicionais (Rain et al. 2013). Várias espécies de vegetais podem ser usadas como alternativa terapêutica pelas atividades biológicas que possuem, no entanto, em relação ao total de espécie de planta do mundo, ainda existem poucos estudos avaliando suas propriedades biológicas (Santos et al. 2012).

A família Burseraceae compreende aproximadamente 600 espécies e 21 gêneros, com maior concentração na América do Sul, essa família é representada principalmente pelo gênero *Protium* com 135 espécies (Moraes et al. 2012). As principais características deste gênero são produzir resinas, que são usadas na medicina popular como anti-inflamatório, imunostimulante, repelentes, antinociceptiva e antineoplásica (Dias et al. 2011).

A espécie *P. ovatum*, conhecida popularmente como almecega (Castelo et al. 2010) é um arbusto que varia de 0,4 – 4 m, com florescência de abril a setembro e frutos em setembro. Apresenta distribuição nos Cerrados e Cerradões de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais, sendo mais rara em Sergipe, Bahia e São Paulo (Lima et al. 2005). Esta espécie é nativa do Brasil, e ocorre tanto no bioma Cerrado quanto no bioma Floresta Amazônica, porém é mais associada a formações savânicas como o Cerrado (Daly 2016). A *P. ovatum* geralmente é confundida com a *Protium heptaphyllum*, no entanto a primeira possui os filetes alongados (ca. 2 mm) e as flores masculinas possui o disco intraestaminal com cerca de 1 mm, enquanto *P. heptaphyllum* é menor (ca. 0,5 mm) (Lima et al. 2005).

A leishmaniose é uma doença causada por um protozoário digenético do gênero *Leishmania* que afeta cerca de 2 milhões de pessoas por ano, e é também considerada uma doença endêmica em 88 países, e cerca de 350 milhões de pessoas estão sob o risco (Neto et al. 2016). Essa doença compreende formas clínicas modificadas e pode ser dividida em dois grupos principais: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). No Brasil, a LTA e a LV ocorrem em todo território nacional, e são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, fato que se deve as características econômicas e culturais dessas populações, predominando nos estados da Bahia, Ceará e Maranhão (Dutra et al. 2008).

A tripanossomíase americana, conhecida como doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e pode ser transmitida aos humanos através das fezes dos insetos triatomíneos infectados, alimentos contaminados, transfusão sanguínea e transplante de órgãos a partir de doadores infectados (Delmondes et al. 2014). A doença de Chagas afeta principalmente pessoas pobres nos países em desenvolvimento, fato atribuído as condições de saneamento básico e higienização. Estima-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas com Chagas nas Américas, e dois milhões delas só no Brasil, a tripanossomíase e a leishmaniose estão entre as doenças infecto-parasitárias que mais preocupam os órgãos de saúde pública, pela frequência em que ocorre e principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que podem ocorrer (Sobral et al. 2014).

O desenvolvimento de novos fármacos eficazes no tratamento desses parasitas é alvo de constantes discussões no meio científico. Para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol são os fármacos de destaque para a terapia medicamentosa dessa doença, tanto pela eficácia na fase aguda quanto pela tolerância. Entretanto, as ações desses fármacos sofrem influências de algumas condições, como a duração do tratamento e a idade (Delmondes et al. 2014).

Já no caso da leishmaniose, nas formas cutâneas e visceral, o tratamento é baseado em agentes quimioterápicos que são compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) e anfotericina B, que infelizmente são considerados tóxicos, e esses fármacos apresentam várias limitações, incluindo os custos e a necessidade de administração parentérica diária. Nos últimos anos, há vários estudos promissores que mostram o efeito de alguns extratos de plantas e óleos essenciais no tratamento da leishmaniose (Antinarelli et al. 2015).

Os óleos essenciais são misturas complexas de constituintes voláteis que são biosintetizados por plantas aromáticas, são mais comuns em folhas, flores, brotos e frutos, mas também podem ser encontrados em sementes, raízes, madeiras ou casca. São armazenados nas secreções de células, cavidades, canais, células epidérmicas, ou tricomas glandulares (Rain et al. 2013).

Os produtos naturais são importantes no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos (Pupo et al. 2007), deste modo, o presente trabalho teve como objetivo descrever pela primeira vez a composição química e a atividade antiparasitária *in vitro* do óleo essencial das folhas de *P. ovatum* (Burseraceae).

3.2. MATERIAL E MÉTODO

3.2.1. Material vegetal

As folhas frescas de *P. ovatum* foram coletadas no mês de julho de 2015 na região do Cerrado da Universidade de Rio Verde (UniRV), no município de Rio Verde, no estado de Goiás, Brasil (17° 47' 53" S / 50° 55' 41" W). A planta foi identificada pela bióloga Erika Virginia Estefâne de Jesus Amaral (Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, GO) e uma amostra foi depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto com exsicata de nº HJ 7420.

3.2.2. Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas frescas de *P. ovatum*. As folhas foram reduzidas em moinho de facas e submetidas à extração do óleo essencial pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger a temperatura de 100° C durante 4 horas (Xavier et al. 2016). Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação. Foram realizadas três lavagens do hidrolato com três porções de 10 mL de diclorometano. As amostras do óleo essencial foram armazenadas a – 4°C até posteriores ensaios químico e biológico.

3.2.3. Análise do óleo essencial por CG-EM

O óleo essencial foi diluído em hexano e submetido à análise em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-5000 da Shimadzu[®] com detector por espectrometria de massas (CG-EM). A análise foi realizada em coluna capilar de sílica fundida, modelo DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) da Shimadzu[®], sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A injeção em modo Split 1:20 foi realizada com injetor a 240 °C. A temperatura do detector foi de 270 °C e o forno de 60 a 180 °C a 3 °C.min⁻¹. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C₁₀-C₂₉) que foram coinjetados com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados da espectroteca Wiley e Nist e da literatura (Adams. 2007).

3.2.4. Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*

Para avaliação da atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonenses* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Posteriormente, cerca de 1x10⁶ parasitos foram distribuídos em placas de 96 poços e os óleos essenciais foram previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) e adicionados nas culturas nas concentrações de 3,12 a 50 µg mL⁻¹. Anfotericina B foi adicionada nas culturas nas concentrações de 0,19 a 3,12 µg mL⁻¹. As culturas foram incubadas a 25° C em estufa BOD (Quimis) por 24 horas e a atividade leishmanicida foi determinada pela inibição do crescimento das formas promastigotas pela contagem em câmara de Neubauer (Global Glass – Porto Alegre, BR) do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1 % de DMSO (Synth) e como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (Eurofarma – São Paulo, BR) na concentração de 1 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de lise em relação ao controle negativo (0,1 % DMSO). Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50 % (CI₅₀) foram determinados por meio de curvas de regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, USA). Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de

Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

3.2.5. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro*

O ensaio tripanocida *in vitro* foi realizado utilizando a cepa Y de *T. cruzi* constituídas por formas tripomastigotas delgadas. Esta cepa vem sendo mantida no Biotério da Universidade de Franca, através de repiques sucessivos em camundongos Swiss, por punção cardíaca no dia do pico parasitêmico (7º dia da infecção). Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

O ensaio foi realizado utilizando sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7º dia da infecção). O sangue infectado foi diluído com solução fisiológica de forma a se obter a concentração final de sangue com 10^6 formas tripomastigotas mL^{-1} . As amostras dos óleos essenciais foram diluídas em DMSO e alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao sangue infectado na placa de microtitulação (96 poços), totalizando o volume de 200 μL . Para a realização do ensaio tripanocida, as amostras foram avaliadas em triplicata nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controles foram utilizados: (1) Controle positivo: benzonidazol; (2) Controle negativo: 0,5 % de DMSO. A microplaca foi incubada a 4º C por 24 horas, sendo que após este período, a atividade foi verificada quantitativamente, através da contagem das formas tripomastigotas, de acordo com a técnica empregada por Brenner (1962) e a determinação da porcentagem de lise parasitária foi realizada através da comparação com o grupo de controle sem tratamento. Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50 % (CI_{50}) foram determinados por meio de curvas de regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, USA).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das folhas de *P. ovatum* forneceu rendimento de 0,3 %, maior que o encontrado anteriormente por Castelo et al. (2010) em estudo desenvolvido com a mesma espécie. Na Tabela 1, estão apresentados os 18 constituintes químicos

identificados com suas respectivas concentrações relativas, correspondendo a cerca de 76,2 % do total do óleo essencial avaliado. Os constituintes majoritários identificados foram: espatulenol (17,6 %, **1**), oxido de cariofileno (16,4 %, **2**), E-cariofileno (14,0 %, **3**) e o mirceno (8,4 %, **4**). Os componentes identificados, índices de retenção e porcentagem relativa (%) estão apresentados na Tabela 1.

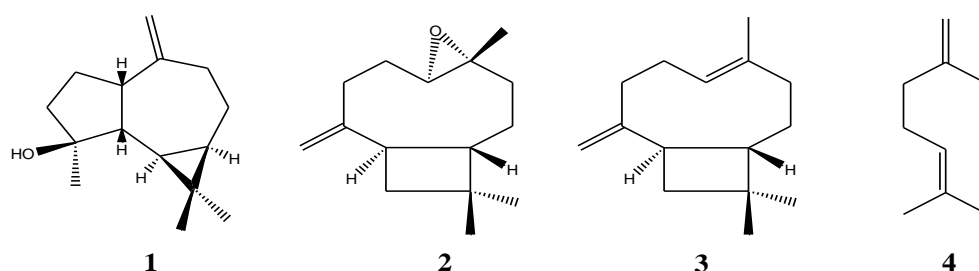


Figura 1: Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *P. ovatum*: (1) espatulenol, (2) óxido de cariofileno, (3) E-cariofileno e (4) mirceno.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de *Protium ovatum*.

Compounds	Retention time	RI _{Lit}	RI _{exp}	Area %
α -Pinene	6.29	932	933	1.2
Sabinene	7.51	969	972	1.8
β -Pinene	7.63	974	976	2.1
Myrcene	8.07	988	991	8.4
γ -3-Carene	8.78	1008	1011	1.5
<i>p</i> -Cimene	9.30	1020	1024	0.3
Limonene	9.46	1024	1028	1.8
Terpinen-4-ol	15.62	1174	1178	0.4
α -Copaene	24.17	1374	1376	6.4
Bourbonene	24.52	1387	1386	0.3
E-Caryophyllene	25.99	1417	1420	14.0
α -Humulene	27.39	1452	1453	1.3
Allo-Aromadendrene	27.68	1458	1462	0.3
Dauca-5,8-diene	28.50	1471	1471	0.6
Cubebol	29.83	1515	1515	0.2
γ -Cadinene	30.20	1522	1525	1.4
Spathulenol	32.30	1577	1578	17.6
Caryophyllene oxide	32.51	1582	1583	16.4
Total (%)				76.2

RI_{lit}: Retention index from the literature. RI_{exp}: Retention index determined relative to n-alkanes (C₁₀-C₂₉) on the DB-5 column. %RA: Relative area (peak area relative to the total peak in the GC-MS chromatogram), average of three replicates.

O espatulenol, óxido de cariofileno, *E*-cariofileno e o mirceno totalizaram 56,4 % da composição química do óleo essencial de *P. ovatum*. É reportado na literatura que os compostos de determinada área menor que 8% são considerados minoritários (Xavier et al. 2016).

A composição química e as propriedades biológicas de óleos essenciais têm sido amplamente estudadas (Estevam et al. 2016 b). Desta forma, destaca-se que outras espécies do gênero *Protium*, apresentaram composição química semelhante à observada neste trabalho. O sesquiterpeno óxido de cariofileno foi identificado como componente majoritário do óleo essencial das folhas de *P. bahianum* e nas folhas e ramos da espécie de *P. hebetatum* (Moraes et al. 2013, Pinto et al. 2010). Os compostos limoneno e o *p*-cinemo foram determinados no óleo essencial extraído da resina de *P. strumosum*, *P. altsonii* e *P. hebetatum* (Zoghbi et al. 2005, Pinto et al. 2010). O α -pineno e o mirceno também foram encontrados em grandes concentrações do óleo essencial de resinas extraídos da espécie *P. heptaphyllum* (Siani et al. 2011). A presença do espatulenol foi relatada em menor concentração nos óleos essenciais das folhas e ramos de *P. hebetatum* (Pinto et al. 2010), nas folhas de *P. pilosum* e resinas de *P. strumosum* (Zoghbi et al. 2005). Em contraposição, o sesquiterpeno espatulenol foi identificado em maior concentração no óleo essencial extraído das folhas de *P. heptaphyllum* (Carvalho et al. 2013).

Os resultados obtidos através avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial das folhas de *P. ovatum* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Atividade leishmanicida do óleo essencial das folhas de *P. ovatum* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Amostras	Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) \pm Desvio Padrão					CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	50	25	12,5	6,25	3,12	
<i>Protium ovatum</i>	98,84 \pm 1,08	89,62 \pm 2,40	79,82 \pm 2,45	78,52 \pm 7,39	63,39 \pm 2,87	1,56
Anf. B	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	
	98,14 \pm 0,44	89,08 \pm 0,89	75,73 \pm 1,17	13,06 \pm 0,94	4,87 \pm 1,31	0,60

OEs: óleos essenciais; CI₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Controle negativo: Meio RPMI +0,1% DMSO; Anfotericina B (CI₅₀ de 0,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

O valor de $CI_{50} = 1,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$, é considerando muito promissor, quando comparado ao da Anfotericina B ($CI_{50} = 0,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 2). É descrito na literatura que o α -pineno possui reconhecida atividade leishmanicida frente a *L. brasilliensis*, o que pode justificar a alta atividade antiparasitária do óleo de *P. ovatum*, embora, esse terpeno apresente em sua composição a concentração inferior a 10 % (Tabela 1) (Sobral et al. 2014). Por outro lado, o E-cariofileno possui atividade contra *L. braziliensis* (Meneguetti et al. 2015), visto que este terpeno está em sua concentração superior a 10 %, podendo ser uma justificativa relevante para o potencial leishmanicida dessa espécie. Outro fator que pode acarretar em uma boa atividade antiparasitária é o sinergismo dos constituintes químicos majoritários presentes no óleo essencial, ou pela presença de outros constituintes que também podem ser ativos mesmo que estejam em baixas concentrações (Melo et al. 2011). É relevante destacar a eficácia de alguns óleos essenciais que apresentaram maiores atividades biológicas quando composto de todos seus constituintes juntos, minoritários e majoritários, ao invés de apenas seus constituintes majoritários misturados. Sugere-se dessa forma, que os constituintes minoritários também são cruciais para a atividade apresentada (Santos et al. 2012).

Os óleos essenciais das folhas de *P. ovatum* apresentaram ainda uma expressiva atividade tripanocida quando testados frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Observou-se o aumento de lise dos parasitos com o aumento da concentração do óleo essencial, com valores de CI_{50} de $5,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando como padrão o benzonidazol ($CI_{50} = 9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade tripanocida do óleo essencial das folhas de *P. ovatum* frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*.

EO	% de lise±D.P./concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							$IC_{50}(\mu\text{g mL}^{-1})$
	400	200	100	50	25	12,5	6,25	
<i>P. ovatum</i>	100±0	99,5±0,4	98,3±1,0	86,8±0,4	77,9±1,4	75,1±3,8	51,6±1,0	5,4

*OE: óleo essencial; D.P.: desvio padrão; Controle positivo: benzonidazol ($CI_{50} = 9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A atividade tripanocida do óleo essencial de *P. ovatum* é descrita pela primeira vez neste trabalho. É relatado na literatura que amostras que apresentaram ($CI_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tiveram atividade tripanocida considerada altamente ativa, ativa ($CI_{50} > 10 < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), moderadamente ativa ($CI_{50} > 50 < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e inativa ($CI_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Alves et al. 2012). A alta atividade tripanocida considerada para o óleo

essencial das folhas de *P. ovatum* pode ser atribuída ao *E*-cariofileno que possui comprovada atividade antiparasitária, visto que esse sesquiterpeno tem concentração superior a 10 % no óleo analisado (Tabela I) (Leite et al.2013, De Pieri, 2012).

3.4. CONCLUSÃO

O óleo essencial das folhas de *P. ovatum* demonstrou em sua composição química a mistura de mono e sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários identificados foram: o espatulenol, óxido de cariofileno, *E*-cariofileno e o mirceno. Em adição, o óleo essencial das folhas de *P. ovatum* exibiu promissor potencial antiparasitário frente aos parasitas *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Estes são resultados relevantes, tendo em vista que as doenças causadas por estes parasitas afetam milhões de pessoas em todo mundo. Em suma, destaca-se que, mesmo diante dos avanços da medicina, as plantas ainda são consideradas fontes promissoras de compostos bioativos que podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS RP. 2007. In Identification of Essential Oil Components by GasChromatography/Quadrupole Mass Apectroscopy, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream. 804 p.

ALVES R T, REGASINI L O, FUNARI C S, YOUNG M C M, RIMOLDI A, BOLZANI V S, SILVA D H S, ALBUQUERQUE S e ROSA J A. 2012. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. Rev. bras. farmacogn. 4: 146-161.

ANTINARELLI L M R., PINTO N C, SCIO E E COIMBRA E S. 2015 Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. An Acad Bras Ciênc.87: 733-742.

BRENNER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. T. S. Paulo, v.4, p. 389-396,1962.

CARNEIRO F B, JÚNIOR I D, LOPES P Q E MACEDO R O. 2010.Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.)

Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. Rev bras farmacogn. 04 : 522-528

CASTELO A V M, MENEZZI C H S D e RESCK I S. 2010. Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C; IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. Cerne Lavras. 16: 573-584.

CARVALHO L E, MAGALHÃES L A M, LIMA M P, MARQUES M O M e FACANALI R. 2013. Essential oils of *Protium* of the Adolpho Ducke Forest Reserve: *Protium crassipetalum*, *P. heptaphyllum* subs. *Ulei*, *P. pilosissimum* and *P. polybotryum*. HBO. 16: 551-554.

DALY D C. [Acesso em 12 Set.2016] Burseraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio [online]<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB16660>>

DELMONDES G.A et al. 2014. Avaliação da citotoxicidade e atividade leishmanicida e tripanocida de extratos de *Passiflora cincinnata* Mast L. Cad Cult Cienc. 13.

DE PIERI F A. 2012. Atividade sinérgica entre terpenos obtidos do gênero *Copaifera* sobre o agente etiológico da Doença de Chagas. RVq. 4: 343-346.

DIAS M O, HAMERSKI L e PINTO A C. 2011. Separação semipreparativa de α e β – amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. Quim Nova. 34:704-706.

DUTRA R C, BRAGA F G, COIMBRA E S, SILVA A D e BARBOSA, N R. 2009 Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatos* Vogel. Rev bras farmacogn. 9: 429-435.

ESTEVAM E E B et al. 2016. Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica do extrato hidroalcoólico das raízes de *Tradescantia sillamontana* Matuda (veludo branco) (Commelinaceae). Rev Bras Pl Med. 18: 415-422.

FABRI R L, COIMBRA E S, ALMEIDA A C, SIQUEIRA E P, ALVES T A M, ZANI C L e SCIO E. 2012. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. An Acad Bras Ciênc. 87: 1073-1080.

LEITE N F et al. 2013. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. Rev cubana plant med. 18: 522-528.

LIMA L R, PIRANI J R, BURSERACEAE IN, WANDERLEY M G L, SHEPHERD G J, MELLEME T S, MARTINS S E, KIRIZAWA M e GIULIETTI AM. 2005 (eds) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de botânica. 04: 163-168.

MELO et al. 2012. Schistosomicidal Activity of the Essential Oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against Adult *Schistosoma mansoni* Worms. Molecules. 16: 762-773.

MENEGUETTI D U O, LIMA R A, MACEDO S R A, BARROS N B, FACUNDO J B, MILITÃO J S L T, NICOLETE R e FACUNDO V A. 2015. Plantas da Amazônia com potencial leishmanicida *in vitro*. Rev Patol Trop. 44: 359-374.

MORAES M M M, CAMARA C A G e RAMOS C S. 2013. Seasonal variation in the Essential Oil *Protium bahianum* Daly (Burseraceae). J Essent Oil Bear Pl. 16: 300-307.

NETO B M, LEITÃO J M R S, OLIVIERA L G C, SANTOS E M S, CARNEIRO S M P, RODRIGUES K A F, CHAVES M H, ARCANJO D D R e CARVALHO F A A. 2016. Inhibitory effects of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) against the infection and infectivity of macrophages by *Leishmania amazonenses*. An Acad Bras Ciênc.

NUSSENZWEIG V, KLOTZEL J K, SONNTAG R, BIANCALANA A, FREITAS J L P A, NETO V e KLOETZEL J K. 1953. Ação de corantes trifenil-metânicos sobre o *Trypanosoma Cruzi in vitro*. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. *Hospital*. 44: 731.

PINTO D S, CARVALHO L E, LIMA M P, MARQUES O M, FACANALI R e RIBEIRO J E L S. 2010. Volatiles of foliar rachis, branches and resin elicited by insects from *Protium hebetatum* Grows wild in amazona. Journal of essential oil bearing plants. 13: 699-703.

PUPO M T, GALLO M B C e VIEIRA P C. 2007. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. Quim Nova. 30: 1446-1455.

RAIM K e KON K V. 2013. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their componentes. 01: 65-132

RODRIGUES W, BARBOSA G F. 2012. Plantas medicinais: Uma alternativa econômica para a conservação do Cerrado Brasileiro? Informe Gepec. 16: 160-175.

SANTOS T G, REBELO R A, DALMARCO E M, GUEDES A, GASPER A L, CRUZ A B, SCHIMIT, A P, CRUZ R C B, STEINDEL M e NUNES R K. 2012. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C.PRESL.) C. DC. Quim nova. 35: 477-481.

SIANI A C, RAMOS M F S, MONTEIRO S S, SANTOS R R e SOARES R O A. 2011. Essential oils of the oleoresins from *Protium heptaphyllum* Growing in the Brazilian southeastern and their cytotoxicity to neoplastic cells lines. Jour of Essen Oi Bea Pla. 14: 373-378.

SOBRAL, C.E.S.et al. 2014. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário *in vitro* do α – pineno e carvacrol. Acta toxicol Argent. 22: 76-80.

XAVIER M N, ALVES J M, CARNEIRO N S, SOUCHIE E L, SILVA E A J, MARTINS C H G, AMBROSIO M A L V, EGEA M B, ALVES C C F e MIRANDA M L D. 2016. Composição química do óleo essencial de *Cardiophyllum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. RVq 20.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Os óleos essenciais das folhas de *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram em sua composição química a mistura de mono e sesquiterpenos, sendo identificados 17 constituintes químicos para o *C. limonia* e 18 constituintes químicos para o *C. latifolia*. Os componentes majoritários desses óleos foram limoneno (40 e 46,3 %), nerol (6,8 e 10,0%) e 1,8-cineol (13,4 e 4,1%) respectivamente. Quando avaliados frente às bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis* o óleo essencial de *C. limonia* apresentou CIM de (200/ 100/ 400/ 400/ 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e *C. latifolia* (100, 200, 100, 400, 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) respectivamente, sendo descrito na literatura, que amostras que apresentaram CIM de 100 a 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ tiveram a atividade bacteriana considerada moderada, e somente acima de 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ inativa, diante disso os óleos essenciais dos Citrus exibiram moderada atividade antibacteriana.

Os óleos essenciais dessas espécies ainda exibiram moderada atividade tripanocida, o *C. limonia* ($\text{CI}_{50} = 88,2 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e *C. latifolia* ($\text{CI}_{50} = 51,7 \mu\text{g. mL}^{-1}$), sendo reportado que as amostras que exibiram $\text{CI}_{50} > 50 < 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ tiveram sua atividade tripanocida considerada moderadamente ativa e somente acima de $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g. mL}^{-1}$ são considerados inativas. Esses óleos também apresentaram moderada citotoxicidade em fibroblastos com $\text{CC}_{50} = 422,9 \mu\text{g. mL}^{-1}$ observado para o óleo essencial de *C. limonia* e $\text{CC}_{50} = 502,9 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *C. latifolia*, é descrito que quanto menor o valor de CC_{50} , mais citotóxico é o composto avaliado frente à linhagem celular utilizada.

Os óleos essenciais das duas espécies de Citrus estudadas apresentaram ainda um satisfatório efeito leishmanicida quando testados frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentando valores de CI_{50} de 2,63 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para o óleo essencial de

C. limonia e CI_{50} de 2,03 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *C. latifolia*, utilizando como padrão o anfotericina B ($CI_{50} = 0,60 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

O óleo essencial das folhas *P. ovatum* demonstrou em sua composição química a mistura de mono e sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários identificados foram: o espatulenol, óxido de cariofileno, *E*-cariofileno e o mirceno, já o fruto verde de *P. ovatum* demonstrou alta concentração de β -mirceno (62,0 %), tornando o fruto desta espécie uma fonte promissora deste metabólito secundário. Também foi avaliada a atividade citotóxica frente aos fibroblastos da linhagem LLCMK2 do óleo essencial dos frutos verdes dessa espécie ($CC_{50} = 550,3 \mu\text{g. mL}^{-1}$), sendo considerada moderada citotoxicidade.

Os óleos essenciais das folhas e frutos dessa espécie ainda foram avaliados frente às formas tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, apresentando valores de 5,4 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente, esses dados são bastante promissores quando comparado com o controle positivo (benzonidazol = 9,8 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), essa espécie apresentou uma atividade tripanocida expressiva para os óleos essenciais avaliados, esse fato pode ser atribuída ao sinergismo dos constituintes químicos majoritários presentes no óleo essencial, ou pela presença de outros constituintes que também podem ser ativos mesmo que estejam em baixas concentrações, pois é relevante destacar a eficácia de alguns óleos essenciais que apresentaram maiores atividades biológicas quando composto de todos seus constituintes juntos, minoritários e majoritários, ao invés de apenas seus constituintes majoritários misturados. Foi avaliado também a atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas dessa espécie frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, com CI_{50} de 1,56 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, sendo considerado bastante promissora contra essa espécie de parasita. Esse fato pode ser atribuído ao *E*-cariofileno que possui comprovada atividade antiparasitária, em concentrações superiores a 10 % no óleo essencial das folhas dessa espécie.

Diante disso, neste presente estudo, foi demonstrado que os óleos essenciais extraídos das folhas e frutos verdes de *P. ovatum* possuem alta atividade antiparasitária frente ao *T. cruzi* e *L. amazonensis*, ressalta ainda, a importância que devem ser realizados outros estudos utilizando experimentos *in vivo* para determinar de maneira mais completa sua eficiência. Esses dados são inéditos, pois, esta foi a primeira vez que se descreveu a composição química do óleo essencial de frutos verdes e das folhas dessa espécie e suas atividades biológicas *in vitro*, destacando a importância deste trabalho para o conhecimento desta espécie botânica.

4. APÊNDICES

4.1. APÊNDICE A – Cromatograma dos óleos essenciais de folhas *C. limonia* e *C. latifolia*.

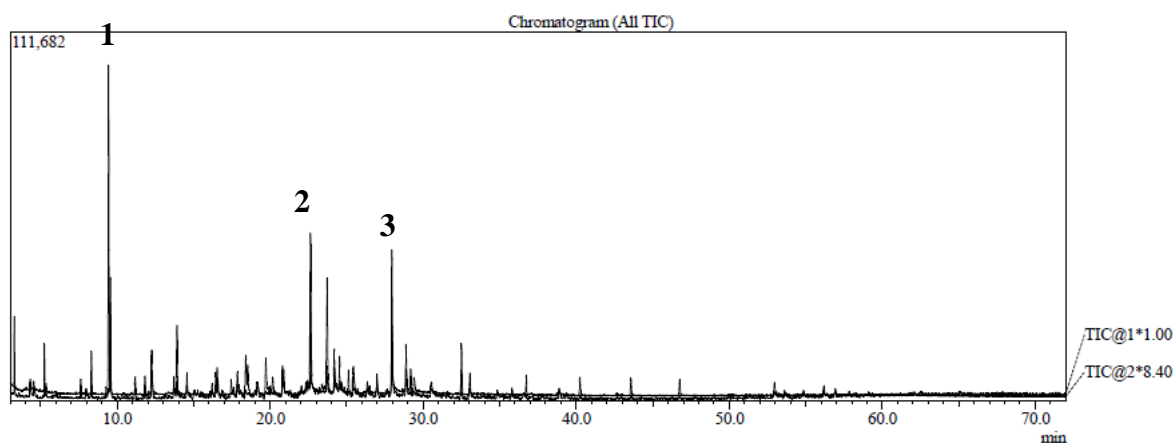


Figura 1A. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de folhas frescas de *Citrus latifolia* (limão tahiti). (1) Limoneno; (2) Nerol; (3) 1,8- Cineol.

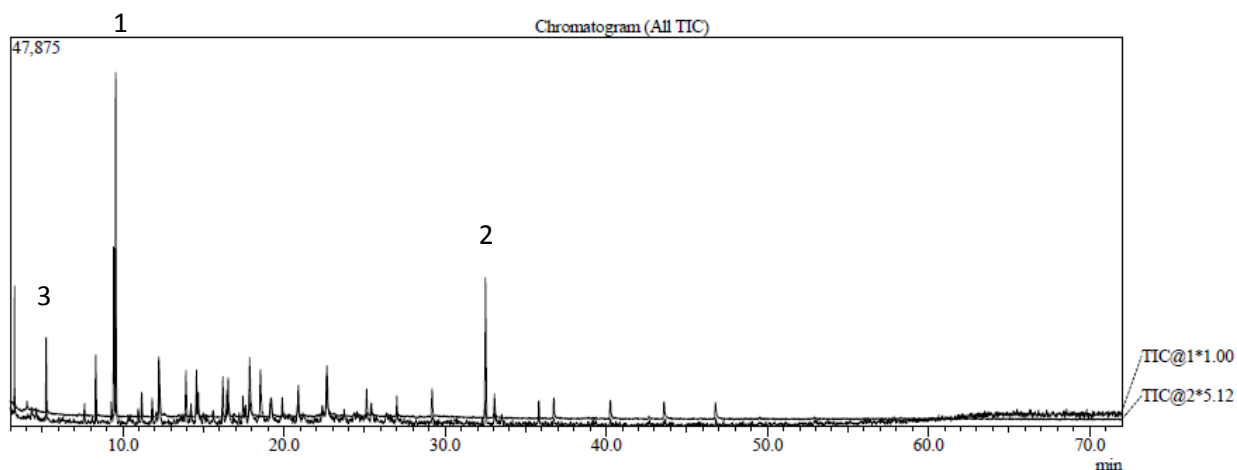


Figura 2A. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de folhas frescas de *Citrus limonia* (limão china). . (1) Limoneno; (2) 1,8- Cineol; (3) Óxido de cariofileno.

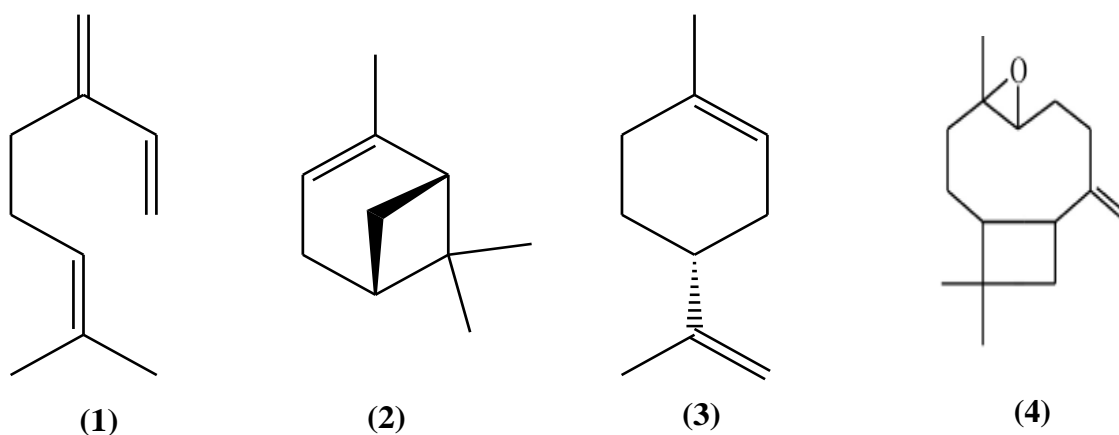


Figura 3A: Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas frescas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia*. (1) Limoneno, (2) Nerol, (3) 1,8-Cineol (4) Oxido de Cariofileno.

4.2.APÊNDICE B– Cromatograma dos óleos essenciais de folhas e frutos de *P. ovatum*

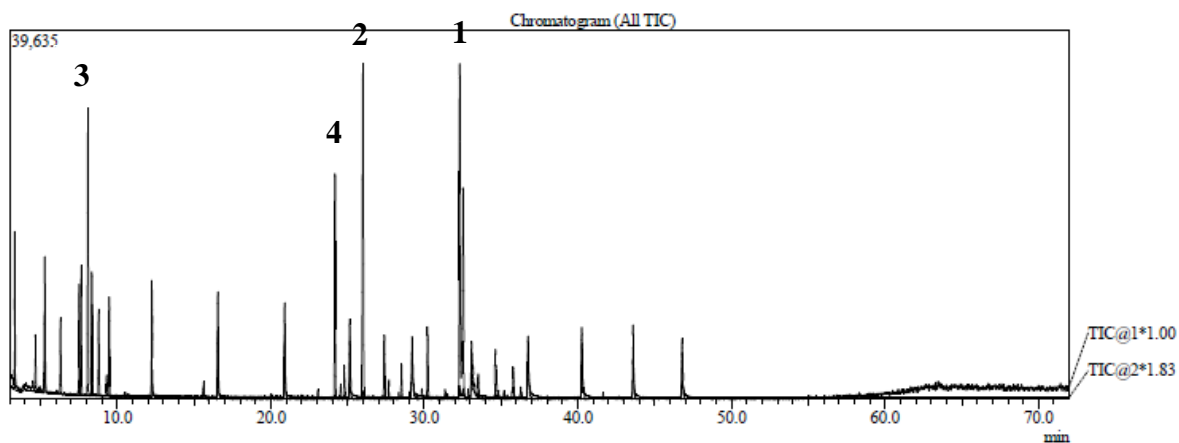


Figura 1B. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de folhas de *P. ovatum* (vick do cerrado). (1) Espatulenol; (2) Óxido de cariofileno; (3) E- cariofileno (4) Mirceno.

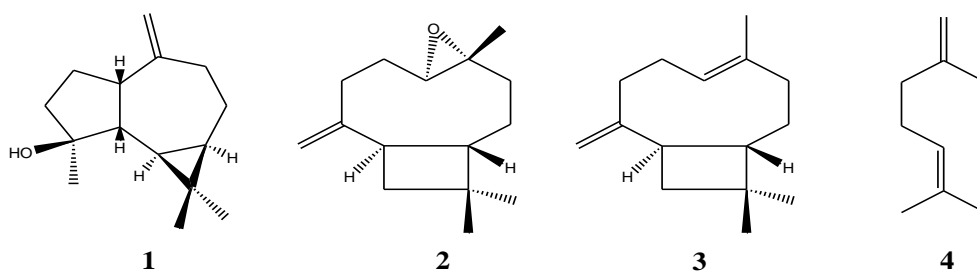


Figura 2B: Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *P. ovatum*: (1) espatulenol, (2) óxido de cariofileno, (3) E-cariofileno e (4) mirceno.

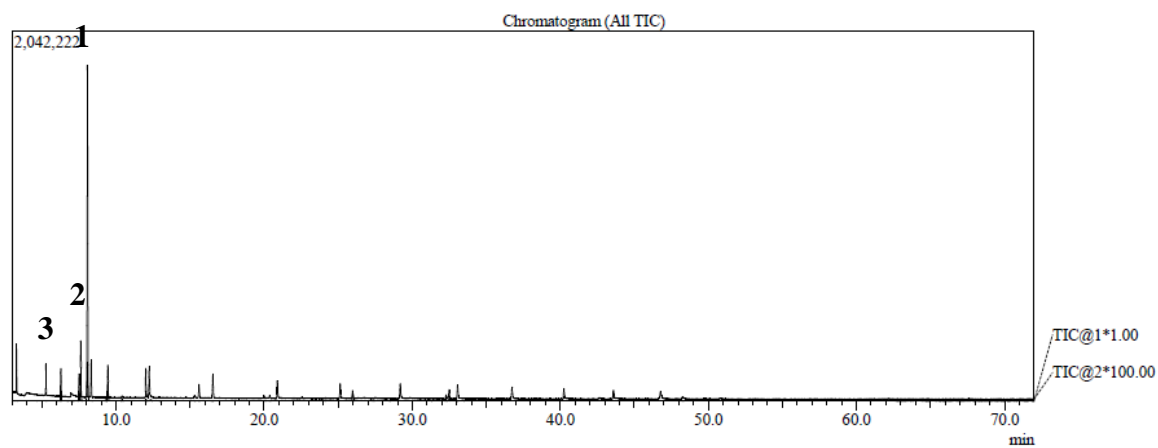


Figura 3B. Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial de frutos verdes de *P. ovatum* (vick do cerrado). (1) β -Mirceno; (2) α -Pinoeno; (3) Limoneno.

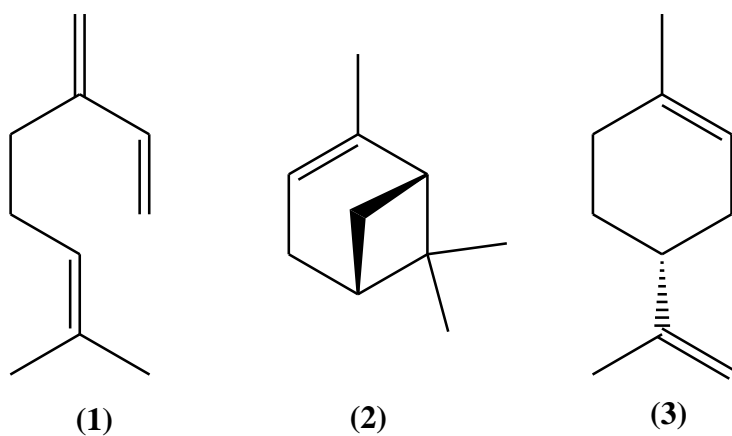


Figura 4B: Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial de frutos verdes *P. ovatum*: (1) β -mirceno; (2) α -pinoeno e (3) limoneno.