



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JUNIEL CRUZ DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA,  
ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus***

PARNAÍBA – PI  
FEVEREIRO – 2017

JUNIEL CRUZ DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA,  
ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Química e Bioquímica

Orientadora: Dra. Leiz Maria Costa Veras

PARNAÍBA – PI  
FEVEREIRO – 2017

JUNIEL CRUZ DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS E AVALIAÇÃO CITOTÓXICA,  
ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Dra. Leiz Maria Costa Veras  
Universidade Federal do Piauí  
(Presidente)

---

Dr. José Delano Barreto Marinho Filho (UFPI)

Universidade Federal do Piauí  
(Membro)

---

Dr. Artur e Silva Filho  
Universidade Estadual do Piauí  
(Membro)

PARNAÍBA – PI  
FEVEREIRO – 2017

À minha mãe, **Maria do Desterro Cruz**, que me deu a vida e me ensinou a viver com humildade e dignidade. E que muitas vezes renunciou aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A você mamãe por natureza e por amor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeira instancia agradeço ao criador de todas as coisas, **Deus** grandioso.

Agradeço a professora por quem tenho grande admiração pela paciência, capacidade de articulação e inteligência, Dra. **Leiz Maria Costa Veras**, que me orientou desde início desta pós-graduação, pessoa sem a qual esse acontecimento não teria se tornado possível.

Ao meu irmão **Rafael Cruz da Silva** que esteve comigo durante todas as etapas árduas dessa próspera conquista.

A minha irmã **Tatila Maria Cruz Silva**.

A pessoa de **Jackline do Val Lima** que esteve fielmente comigo nos bastidores dessa história.

Aos meus amigos Karla Patrícia Uchôa, Taise Dourado, Bartholomeu Araujo Barros Filho, Francisco Artur, João Paulo Rodrigues, Sebastião Maciel de Lima Neto, Luana Veras, Renilson Araujo, Fernando Gomes, Raimundo Soares, Maria Alice Soares, Nielson Furtado, Jéssica Pires Farias, Adelaide Guimarães, Tatiane Boaventura.

Agradeço a Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso pelo auxílio e suporte em grande parte desse trabalho.

Aos professores Dra. Ana Jérsia Araújo; Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes; Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa e Dra. Durcilene Alves da Silva.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa(CNPq); Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes); Fundação de amparo a pesquisa do Piauí FAPEPI.

A empresa fornecedora de recursos vegetais Phytobios.

Muito obrigado!

## RESUMO

O Brasil destaca-se por conter uma das maiores diversidades de espécies de plantas do mundo, as quais produzem substâncias, em que se destacam os óleos essenciais, que possuem diversas propriedades biológicas e tem gerado bastante interesse da indústria farmacêutica, como atividade antioxidante, antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, atividade antitumoral, entre outras. O presente estudo tem como objetivo identificar quimicamente compostos do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*, bem como avaliar a atividade antibacteriana desse composto em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial em células tumorais humanas *in vitro*, avaliar o potencial antioxidante e antifúngico. Para isso, foi feita a extração do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* por meio da técnica de arraste a vapor. Em seguida, realizou-se a caracterização química do óleo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) que mostraram três picos majoritários, identificados como sendo: trans-cariofileno,  $\gamma$ -cadileno e tridecanona. As análises da atividade antibacteriana foram feitas usando concentrações de 20  $\mu\text{g/mL}$  observando-se a concentração inibitória mínima (CIM) por meio do halo formado ao redor dos poços conferindo assim a presença ou ausência de atividade antibacteriana, onde se observou a não atividade para a concentração testada (20  $\mu\text{g/mL}$ ). Para avaliação do potencial citotóxico do óleo *in vitro* foram utilizadas quatro linhagens de células tumorais humanas, nas quais foi observada presença de atividade citotóxica, as mesmas foram testadas SF-295 com  $\text{CI}_{50}$  de 24,5  $\mu\text{g/mL}$ , K-562 com  $\text{CI}_{50}$  de 24,3  $\mu\text{g/mL}$ , PC-3 com  $\text{CI}_{50}$  de 27,8  $\mu\text{g/mL}$  e HCT-116 com  $\text{CI}_{50}$  de 28,4  $\mu\text{g/mL}$ . A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, onde se pode perceber o que o óleo apresentou potencial antioxidante quando comparado a ácido ascórbico. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliação da atividade antifúngica, os resultados mostraram que houve uma inibição dos fungo testados.

**Palavras-Chave:** Ação antibacteriana, Antitumoral, antifúngica, antioxidante, óleo essencial, *Pilocarpus microphyllus*

## ABSTRACT

Natural products have attracted increasing attention due to their ample biodiversity and because they contain an infinity of physical, chemical and biological properties, which give them many applications, such as pharmacological application in the treatment of several pathologies. Brazil is highlighted for being one of the countries with the greatest diversity in species of plants. On majority, these plants produce substances with yet unknown attributes. Essential oils are some of the substances extracted from plants, and they have several biological attributes that interesting the pharmaceutical industry. Some of their attributes are antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, and antitumor. The study aims to chemically identify compounds of the essential oil of *Pilocarpus microphyllus*, as well as to evaluate the antibacterial activity of this compound in Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as to evaluate the cytotoxic potential of essential oil in human tumor cells in *vitro*, Besides evaluating the antioxidant potential and antifungal. To this, the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* was extracted by Steam Distillation Technique. Then, the oil was chemically characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), which showed three major peaks, identified as trans-caryophyllene,  $\gamma$ -cadylene and tridecanone. Analyzes of the antibacterial activity were done by observing the minimum inhibitory concentration (MIC) through the halo formed around the wells, thus conferring the presence or absence of antibacterial activity, where no activity was observed at the concentration tested (20  $\mu\text{g}$  / mL) To evaluate the cytotoxic potential of the oil in *vitro*, we used four human tumor cell lines in which cytotoxic activity where it was observed, SF-295 with  $\text{IC}_{50}$  of 24.5  $\mu\text{g}$  / mL, K-562 With  $\text{IC}_{50}$  of 24.3  $\mu\text{g}$  / mL, PC-3 with  $\text{IC}_{50}$  of 27.8  $\mu\text{g}$  / mL and HCT-116 with  $\text{IC}_{50}$  of 28.4  $\mu\text{g}$  / mL. The antioxidant activity was determined by the DPPH method. The broth microdilution technique was used to evaluate the antifungal activity, the results were satisfactory.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Condensação cabeça cauda de unidades monoméricas de isoprenos.....	05
<b>Figura 2.</b>	Imagem tricoma glandular de <i>Pilocarpus Microphyllus</i> adquirida por microscopia de varredura.....	06
<b>Figura 3.</b>	Principais vias do metabolismo secundário.....	07
<b>Figura 4.</b>	Biossíntese de terpenos.....	09
<b>Figura 5.</b>	Folhas de <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	13
<b>Figura 6.</b>	Diferentes estágios da carcinogênese.....	16
<b>Figura 7.</b>	Estrutura dos compostos identificados no óleo essencial de <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	30
<b>Figura 8.</b>	Cromatografia referente ao tempo de retenção dos compostos indicados.....	31



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG – EM	Cromatografia Gasosa acoplada à espectroscopia de massa
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração inibitória mínima
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% do substrato
HIV	Síndrome da Imunodeficiência Humana
IPP	Isopentenil Difosfato
DMAPP	Dimetilalil Difosfato
GPP	Geranil difosfato
FPP	Farnesil Difosfato
GGPP	Geranilgeranil Difosfato
INCA	Instituto Nacional do Cancer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPM	Desvio Padrão Médio
MTT	Sal de tetrazolium
IE	Impacto por elétrons
eV	Eletro volts
DMSO	Dimetil Sulfóxido
IK	Índice de Kovats
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ERN's	Espécies reativas de Nitrogênio
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	4
2.2 BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	6
2.3 TERPENOS .....	7
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	9
2.5 ÓLEO ESSENCIAL DE JABORANDI ( <i>Pilocarpus microphyllus</i> ) .....	11
2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	13
2.7 CÉLULAS TUMORAIS E CÂNCER .....	14
2.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	19
2.10 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	25
4.2 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> ...	25
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	26
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> .....	27
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	28
4.6 AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA .....	29
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
5.1 RENDIMENTO M/M DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO .....	30
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	31
5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	34
5.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	34
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	36
5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	38
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A fonte de diversidade química que leva a constantes descobertas no ramo farmacêutico são os produtos naturais. Tais produtos são utilizados rotineiramente no desenvolvimento de fármacos utilizados no tratamento de diversas doenças. O Brasil é bastante privilegiado no que diz respeito à diversidade biológica disponível em seus vários biomas, os quais se destacam como potenciais fornecedores de novos agentes terapêuticos. Ao realizar testes utilizando extratos pode-se visualizar claramente a presença de efeitos sinérgicos entre diferentes princípios ativos (GUIMARÃES et al., 2010).

Conhecer os componentes e princípios ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação sempre foi algo desafiador, isso se deve ao fato de a constituição química das plantas apresentarem forma bastante variada e complexa. Portanto existe a necessidade constante de estudos com a finalidade de se conhecer cada vez mais a constituição desses componentes bioativos para que sejam utilizados da melhor forma possível (OLIVEIRA et al., 2014).

Um dos objetivos almejados pela indústria farmacêutica é a descoberta e produção de fármacos que, além de serem eficazes no tratamento contra o câncer bem como de diversas patologias, tenham efeitos colaterais mínimos sobre os pacientes. Por conta disso, os produtos naturais são de grande interesse para a elaboração de novos fármacos. E essas moléculas bioativas inerentes do metabolismo secundário das plantas têm sido estudadas como uma alternativa de terapia menos tóxica para o tratamento de diversas patologias (VARANDA, 2006).

Em se tratando de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, existe um grupo que tem bastante notoriedade, são os óleos essenciais. São voláteis de origem vegetal e possuem terpenos em sua composição química. Eles representam a classe mais importante de substâncias químicas secretadas pelos vegetais. (FIGUEIREDO, 1992). Os mesmos fazem parte do conjunto de substâncias responsáveis pela proteção das plantas contra o ataque de microrganismos, pela polinização e controle da perda de água (OLIVEIRA et al., 2012).

Um exemplo de óleo essencial que vem sendo estudado por suas diversas propriedades farmacológicas é o óleo extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf), da família Rutaceae (VALTER, J.E., et al. 2008 ).

Nos últimos anos a resistência dos microrganismos aos antibióticos tem aumentado, dessa forma a busca de novas drogas é considerada uma necessidade. Portanto, o óleo essencial e seus metabólitos extraídos das folhas da espécie *Pilocarpus microphyllus* podem oferecer um grande potencial na produção de fármacos antibióticos para o tratamento de infecções, principalmente, bacterianas (LIMA., D.F, 2016).

Os óleos ainda podem apresentar diversas funções farmacológicas, como por exemplo, a inibição do crescimento de células tumorais, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, entre outras funções (BRITTO., et al 2012). Alguns pesquisadores têm demonstrado que os óleos essenciais de plantas representam uma importante fonte de moléculas bioativas (PARDHASARADHI, 2005). O câncer é uma doença multifatorial que tem como característica principal o crescimento desordenado e difuso de células. Trata-se de uma doença com distribuição mundial e elevado índice de mortalidade, atingindo milhões de pessoas anualmente. O tratamento já teve muitos progressos e a eficácia das terapias utilizadas já foi comprovada em alguns tipos de câncer. No entanto, um obstáculo nas terapias convencionais é a toxicidade das terapias disponíveis (CATANI, 2014).

Algumas moléculas bioativas presentes em óleos essenciais também atuam como agentes antioxidantes. Radicais livres e espécies nitrogenadas e oxigenadas que atuam com potencial efeito oxidante são consideradas por muitos especialistas como causadores de diversas doenças, como câncer doenças cardiovasculares declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I crônica. Estes óleos representam uma promessa de substituição aos medicamentos atuais contra as patologias causadas por esses radicais livres (NASCIMENTO, J. C., et al, 2011; MIRANDA, C.A.S.F., et al, 2016).

Partindo do princípio de que a concentração e atividade antimicrobiana desses componentes podem variar de um óleo vegetal para o outro (NASCIMENTO., P.F.C., et al . 2007), o presente trabalho visa extrair e caracterizar o óleo essencial, bem como analisar a eficácia das substâncias presentes em óleos essenciais do *Pilocarpus microphyllus* frente à bactérias, fungos, avaliar seu potencial antioxidante, além de avaliar seu potencial citotóxico frente à quatro linhagens de células neoplásicas.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

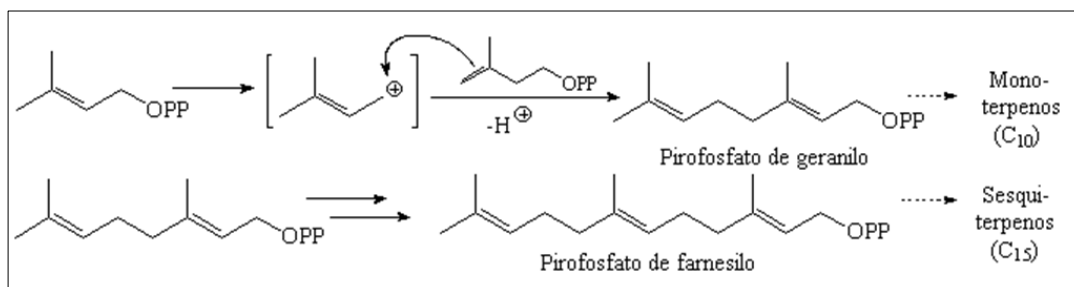
Desde os primórdios o homem busca os princípios ativos encontrados nas plantas como fonte de nutrição e medicamentos, no início isso se dava de modo intuitivo ou baseado em vivências. Com o decorrer do tempo o homem começou a adquirir maiores conhecimentos acerca da adequada utilização desses princípios e seus benefícios. A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais com essas finalidades. Posteriormente, com o avanço científico essa prática ficou menos frequente devido à utilização de medicamentos sintéticos. Mas, devido ao alto custo desses medicamentos e efeitos indesejáveis tanto ao homem quanto ao meio ambiente, a utilização de produtos naturais como alternativa terapêutica voltou a ter destaque (ROCHA, 2006; MACHADO, 2011).

O interesse pelo estudo de plantas medicinais, seus extratos e princípios ativos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. O Brasil, conta com uma flora bastante diversificada em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos compostos químicos, em sua maioria, são desconhecidos. Estima-se que há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8% foram estudadas quanto a sua química, e estima-se ainda que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas. Grande parte da população mundial faz uso de produtos naturais para fins medicinais. Porém, apesar de a medicina tradicional utilizar plantas como principal fonte medicamentosa, apenas 25% dos produtos farmacêuticos prescritos é originada de substâncias encontradas em espécies da flora natural. E apesar do aumento no número de pesquisas nessa área, deixando os pesquisadores impressionados com a diversidade de estruturas, propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos encontrados na natureza, os dados disponíveis mostram que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (VARANDA, 2006).

## 2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas possuem a capacidade de sintetizar metabólitos secundários, estes são responsáveis por desempenhar diversas funções, tais como, proteção contra predadores, fornecimento de coloração às plantas, dentre outras funções importantes para a adaptação e a reprodução das espécies vegetais. Ao contrário dos metabólitos primários, como carboidratos e ácidos graxos, que são produzidos como meio indispensável à vida das plantas, os metabólitos secundários não são necessariamente produzidos sob todas as condições, ou seja, eles são produzidos de acordo com suas características e necessidade específica de cada espécie em seu habitat. Como exemplo de metabólitos secundários, temos a classe dos terpenos, encontrados tanto em plantas quanto em animais, os quais são responsáveis por desempenhar diversas atividades biológicas, como ação anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antiviral, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antiviral, antitumoral, dentre outras. Eles são derivados de unidades de isopreno (C5), que se unem através de ligações cabeça-cauda Figura-1 (DEWICK, 2002; COUTINHO et al., 2009; MIDDLETON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2014).

**Figura 1.** Condensação cabeça cauda de unidade monoméricas de isoprenos. Fonte: adaptado Peres, 2004.



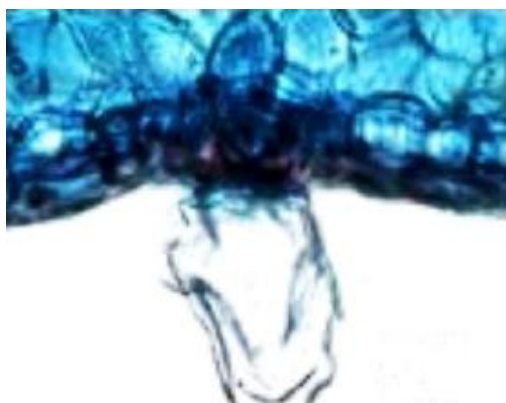
Durante o metabolismo secundário das plantas algumas substâncias são sintetizadas, um exemplo são os óleos essenciais que são compostos naturais, voláteis e complexos, geralmente caracterizados por um forte odor (ROBBERS et al., 1997).

Simões e Spitzer (2003) descrevem os óleos essenciais como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas diferindo-se dos óleos fixos os quais são misturas de substâncias lipídicas não-voláteis obtidas geralmente de sementes, como por exemplo, soja, mamona e girassol.

As características físico-químicas e odores dos óleos essenciais extraídos de diferentes partes de uma mesma planta podem ser diferentes apesar de apresentarem cor e aspecto semelhantes (ROBBERS et al., 1997).

Dependendo da localização do órgão da planta, por exemplo, a composição volátil dos óleos essenciais pode variar (SIMÕES et al., 2000). Isso se dá pelo fato de que os tricomas glandulares, biossintetizadores e armazenadores de óleos essenciais (Figura 2), estarem distribuídos em quantidades diferentes por toda a planta, mas em sua maioria, ocorrem principalmente nas folhas e cálices (LEVIN, 1973).

**Figura 2.** Imagem tricoma glandular de *Pilocarpus Microphyllus* adquirida por microscopia de varredura. Fonte: Adaptado (MUNTOREANU, T. G, 2008)



Óleos essenciais são constituídos de terpenos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos com enxofre. (SIMÕES; SPITZER, 2003). Tais compostos são derivados de terpenoides ou de fenilpropanoides, os quais podem ser originados a partir do ácido mevalônico e do ácido chiquímico, respectivamente (GUENTHER, 1977; SIMÕES et al., 2000).

Além disso, óleos essenciais de plantas em geral têm atraído interesse significativos dos pesquisadores e da indústria farmacêutica devido à vasta diversidade de seus constituintes bioativos, capazes de exercer importante papel na prevenção e tratamento do câncer (BHALLA et al., 2013). Estudos comprovam que alguns óleos apresentam atividades antitumoral ou citotóxica comprovadas, como exemplo se pode citar os óleos da *Guatteria friesiana* (BRITTO et al., 2012), *Cedrelosis grevei* (AFOULOUS et al., 2012), *Guatteria hispida* e *Guatteria blepharophylla* (RIBEIRO et al., 2012), *Lindera umbellata* (MAEDA et al., 2012), *Guatteria pogonopus* (FONTES et al., 2013), *Xylopia laevigata* (QUINTANS et al., 2013), e *Satureja intermedia* (SADEGHI et al., 2013).

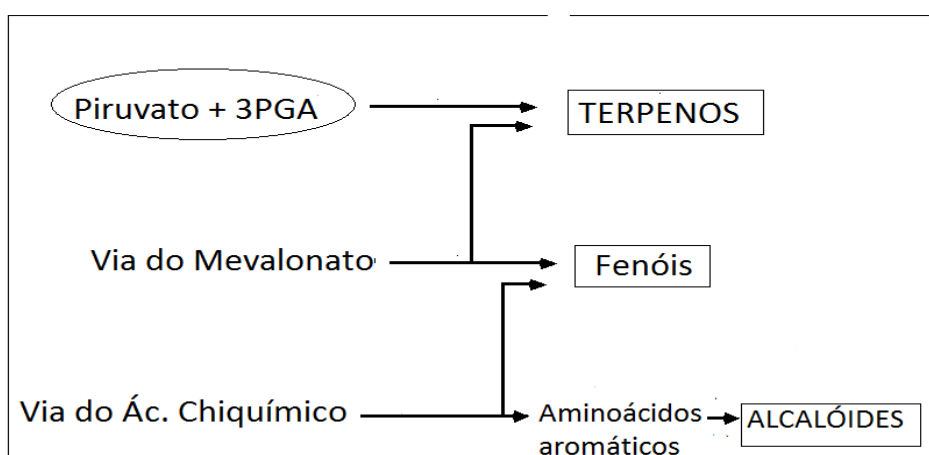
Alguns constituintes isolados de óleos essenciais apresentam atividade anticâncer comprovada como timol, carvacrol,  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -terpineno,  $\beta$ -terpinoleno, 1,8-cineol, mentona, isomentona, eugenol, linalol, citral, citronela, acetato de  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -terpineol, cânfora,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -terpeneno, 4-terpineol, cariofileno, zedoarondiol e borneol (BHALLA et al., 2013).

## 2.2 BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os vegetais são alguns dos seres vivos capazes de sintetizar substâncias cujas funções não estão diretamente relacionadas à manutenção da vida. Tais substâncias são secundárias às moléculas essenciais à vida, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, por isso a rota biosintética que lhes dão origem é denominada metabolismo secundário (SIMÕES et al., 2010).

Os metabólitos secundários das plantas são obtidos por três principais rotas as quais dão origem aos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (FIGURA 3). A biossíntese dos terpenos pode acontecer tanto a partir do ácido mevalônico como piruvato e 3-fosfoglicerato. Os compostos fenólicos derivam tanto do ácido mevalônico como do ácido chiquímico. Já os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) que são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos como a ornitina e a lisina (PERES, 2004).

**Figura 3.** Principais vias do metabolismo secundário. Fonte: Peres, 2004.





### 2.3 TERPENOS

Os óleos essenciais são caracterizados por apresentarem estruturas de cadeias aromáticas e serem voláteis a temperatura ambiente (OLIVEIRA et al., 2012). Nestes óleos podem ser encontrados terpenos, substâncias que apresentam cadeias normalmente apolares e são miscíveis em solventes orgânicos, no entanto eles têm pequena solubilidade em solventes polares, o que torna possível a formação do que chamamos de hidrolatos. Trata-se de substâncias de baixa densidade, quando comparados à água. (FALCÃO, 2012).

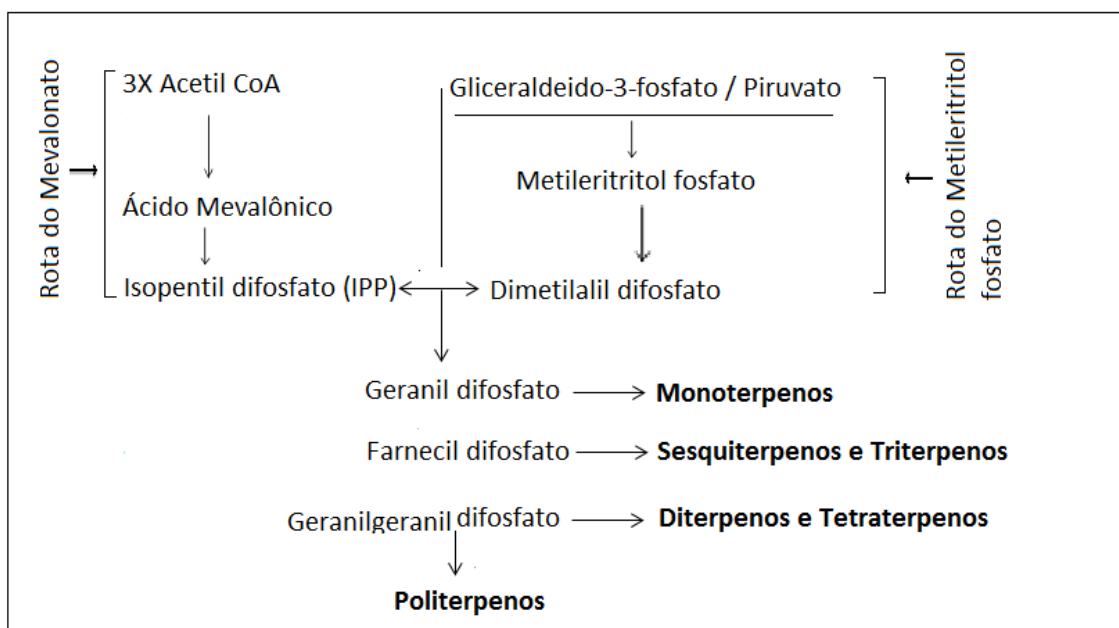
Assim como os ácidos graxos são originados dos acetatos, os terpenoides também são. A diferença entre estas duas moléculas está no fato de que os terpenos possuem ramificação extensa e normalmente são ciclizados (COWAN, 1999).

Segundo Taiz e Zeiger (2004), a biossíntese de terpenos parte de metabólitos primários por meio de duas vias distintas (Figura 4) as quais possuem um mesmo produto comum, o isopentenil difosfato (IPP).

Na primeira via, o ácido mevalônico é formado pela ligação de moléculas de acetil CoA. Este passa por etapas de pirofosforilação, descarboxilação e desidratação para produzir o IPP. A segunda via é chamada rota do metileritritol fosfato a qual ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos onde há a formação do IPP a partir da glicose ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, e também pela combinação do gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Após a formação do IPP e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), os diferentes tipos de terpenos são formados. A reação entre IPP e DMAPP origina o geranyl difosfato (GPP) cujo seus produtos são os monoterpenos. O GPP juntamente com outra molécula de IPP forma o farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. Se mais uma molécula de IPP for adicionada ao FPP, o geranylgeranyl difosfato (GGPP) é produzido gerando os diterpenos. A fim de formar triterpenos e tetraterpenos, os FPP e GGPP se dimerizam (TAIZ; ZEIGER, 2004).

**Figura 4.** Biossíntese de terpenos. FONTE: TAIZ & ZEIGER, 2004 (Adaptado).



De acordo com Raven et al. (2001) existem mais do que milhares compostos terpênicos catalogados. Estes são responsáveis por uma diversidade de funções bioquímicas. Por exemplo, funcionam como pigmentos fotossintéticos, hormônios e compostos de defesa de plantas (LANGE et al., 2000).

No que diz respeito às suas atividades biológicas, os terpenoides possuem ação antimicrobiana, fungicida, antiviral, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e antiparasitária (PADUCH et al, 2007 apud MACHADO et al., 2011). Segundo Cowan (1999), o mecanismo de ação de terpenos contra microrganismos está associado ao rompimento de membrana pelos compostos lipofílicos e consequente extravio do meio intracelular, o que tem como resultado a morte dos microrganismos.

Algumas aplicações dos terpenoides podem ser vistas em uma variedade de estudos. Pesquisadores descobriram que o controle da bactéria *Listeria monocytogenes* pode ser feito pela ação de terpenóides presentes em óleos essenciais de plantas (AURELI

et al., 1992). Além disso, Oliveira et al., (2014) afirmam que há um crescimento no desenvolvimento de novos fármacos contendo terpenos com atividade analgésica.

Cerca de 300 tipos de óleos essenciais são comercializados mesmo sendo conhecidos uma faixa de 3000 diferentes tipos de óleos (DOURADO et al., 2014). Eles encontram emprego na indústria devido a suas várias aplicações, das quais podemos citar: o composto D-limoneno que age causando a morte de células cancerosas e inibindo o crescimento das mesmas, o D-limoneno ainda é usado como herbicida, inseticida, solventes de resina, borrachas, obtenção de sabores artificiais de hortelã e menta, fabricação de doces, balas de mascar, xampus e matéria prima para a fabricação de outros compostos químicos; O Linalol(C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) é um monoterpene prevalente em vários óleos essenciais e é um importante intermediário na produção da vitamina E e ponto de partida para produção de vitamina A; O Citronelol(C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O) é utilizado como repelente, aromatizante e tem ação acaricida; o Citronelal retirado da Citronela de Java, planta adaptada a diversas regiões tropicais do Brasil, é conhecido pela população como repelente do mosquito *Aedes aegypti*; O óleo essencial do Alecrim (*Rosmarinus Officinalis*) é destaque pois seus componentes tem princípios ativos importantes a indústria farmacêutica e de cosméticos, como por exemplo, aromatizante, água de colônia, tônicos e estimulantes. (STEFFENS, 2010).

#### 2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Sua extração é realizada através de diversas técnicas e suas propriedades dependem do tipo de extração. Os métodos mais utilizados são: extração por arraste a vapor, hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, extração por alta pressão e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (MACHADO, 2011).

O processo de arraste a vapor é muito utilizado por sua boa relação custo benefício. Esse método consiste em colocar o material vegetal em um destilador, onde, através da passagem do vapor pelo material vegetal, ocorre a extração dos compostos voláteis da planta. Posteriormente, o material obtido passa através de um sistema de condensação e é coletado em um recipiente de decantação, onde o óleo formado separa-se naturalmente da água. Em seguida a água em excesso é retirada do recipiente através de uma torneira e o óleo essencial obtido é colocado em um funil de decantação para que haja uma separação minuciosa da água. Posteriormente é envasado em vidro âmbar e mantido em local abrigado de calor e luminosidade (CASTRO et al., 2005).

A técnica da hidrodestilação consiste na separação dos componentes de uma mistura por meio das diferenças em suas pressões de vapor. O material vegetal permanece em contato com as moléculas de água em ebulição, o vapor formado força a abertura das paredes celulares, permitindo a evaporação do óleo que está situado entre as células da planta. O vapor formado que consiste de uma mistura de moléculas de água e de óleo é então resfriado por um condensador, gerando um produto líquido de duas fases, visto que, trata-se de dois líquidos imiscíveis e que posteriormente serão separados (BIASI; DESCHAMPS, 2009; SARTOR, 2009; SILVA, 2011).

A técnica de prensagem a frio, também conhecida como prensagem hidráulica e escarificação é um método empregado para se obter óleos essenciais de frutos cítricos, visto que, esse método permite a obtenção do óleo essencial puro do fruto. Neste processo as frutas são colocadas inteiras na prensa hidráulica e delas são extraídos simultaneamente o óleo e o suco, em seguida o óleo pode ser separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada (PINHEIRO, 2003; SIMÕES et al., 2003).

O método de extração por solventes orgânicos se caracteriza por apresentar maiores rendimentos de produtos que não podem ser obtidos por nenhum outro processo, visto que, determinados tipos de óleos são muito instáveis e não toleram aumentos de temperatura, fazendo-se necessária a utilização de solventes orgânicos para sua extração (FILIPPIS, 2001). Nesse método, inicialmente a matéria-prima que contém o óleo é imersa em um solvente adequado como a acetona ou qualquer outro derivado de petróleo, e nesse ponto a separação é realizada, em seguida o solvente é removido por evaporação ou destilação à pressão reduzida, gerando um extrato denso e resinoso (POVH et al., 2000). Porém, tal método possui limitações, pois é praticamente impossível remover todo o solvente residual sem um grande gasto de energia e custos (BERNARDO-GIL et al., 2003). Além disso, os solventes podem gerar alterações químicas nas moléculas do óleo essencial e provocar efeitos tóxicos nos consumidores, portanto, o solvente residual pode ser indesejável devido a sua toxicidade, a sua capacidade reagente ou até mesmo pela interferência no aroma e sabor do extrato (SARTOR, 2009).

A extração por fluido supercrítico é uma técnica que consiste em se empregar um fluido em condições supercríticas o qual apresenta características intermediárias entre um gás e um líquido. O processo de extração com fluido supercrítico pode ser dividido em quatro etapas principais: dessorção do analito da matriz, solubilização do analito pelo

fluido supercrítico, arraste do analito para fora da célula de extração e coleta do analito extraído. O processo de extração se inicia com o bombeamento do solvente para a célula extratora que contém a amostra, onde o gás é aquecido e pressurizado até chegar às condições críticas. Na célula extratora há o contato entre a amostra e o fluido supercrítico, podendo ser de maneira dinâmica onde o fluido atravessa constantemente a amostra ou de maneira estática onde se emprega uma quantidade fixa de fluido supercrítico que em contato com a amostra por um tempo determinado, ocorrendo a extração, em seguida o extrato obtido é levado a um restritor fixo ou variável, no qual há o controle de temperatura e pressão. A despressurização permite que o extrato seja separado do fluido que retorna ao seu estado físico original, em seguida é recolhido em um sistema de coleta o qual geralmente utiliza um solvente, um sistema criogênico, uma retenção em fase sólida adequada ou ainda um acoplamento on-line com um sistema de análise ou detecção, enquanto o solvente extrator geralmente é recolhido e reciclado (CHESTER et al., 1994).

## 2.5 ÓLEO ESSENCIAL DE JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*)

Várias espécies da família Rutaceae são importantes devido ao seu valor econômico para alimentação, ornamentação e usos medicinais. O gênero *Pilocarpus* é pertencente à família das Rutaceae e encontra-se distribuído largamente pela América do Sul e América Central, a maioria das espécies desse gênero são nativas do Brasil. O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf) encontra amplas aplicações (SABÁ et al., 2002; SANTOS E MORENO, 2004). Constantemente utilizado como ornamentos e usos medicinais o que pode proporcionar a produção de diuréticos, sudorífico, digestivo, sialogogo (CORRÊA, 1969), tônico capilar, anti-inflamatório dos olhos, e principalmente, para a extração industrial de pilocarpina, um alcaloide imidazólico (SANTOS et al., 2004). Além disso, pode ser utilizada no tratamento de febres, estomatite, bronquite, gota, psoríase, doenças renais, entre outras (HOLMSTED et al., 1975).

A exploração do jaborandi é responsável por uma grande massa de recursos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em 2013, movimentou em torno de 291 toneladas no norte e nordeste brasileiro perfazendo aproximadamente R\$ 1,2 milhões de um total de R\$ 4,5 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil naquele ano (IBGE, 2013).

O gênero *Pilocarpus* (família Rutaceae), também conhecido como “Jaborandi”, constitui um arbusto ou árvoreta de aproximadamente 3-7,5 m de altura o qual é

consideravelmente encontrado no Brasil, desde o norte do Pará ao Rio Grande do Sul (JOSEPH, 1967) sendo que, os estados que mais produzem esse material vegetal são Pará, Maranhão e Piauí (MARQUES E COSTA, 1994). Compreendem aproximadamente 13 espécies e 78 variedades as quais ocorrem em todas as regiões neotropicais, sendo totalmente ausente na bacia Amazônica (TAVEIRA et al., 2002). Suas folhas compostas medem cerca de 40 cm quando adultas e folíolos coriáceos, de forma lanceolada, variando com a espécie. As flores do jaborandi (*P. microphyllus*) são pequenas e arranjadas em cachos compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso (MARQUES E COSTA, 1994).

**Figura 5.** Folhas de *Pilocarpus microphyllus*. Fonte: Autoria própria.



A partir de espécies de (*Pilocarpus* sp) já foram identificadas as estruturas de diversos alcaloides, os quais possuem diversas atividades biológicas. Na espécie *P. microphyllus* destacam-se a pilocarpina. A pilocarpina é um alcalóide dentre os isolados das espécies de jaborandi que pode agir sobre o sistema nervoso central como um colinérgico direto, estimulando o sistema parassimpático (bexiga, canais lacrimais, glândulas sudoríparas e salivares). Este alcalóide é a droga eleita no tratamento de glaucoma, que é uma lesão do nervo óptico que pode provocar cegueira no indivíduo afetado e atinge milhares de pessoas anualmente no Brasil. Além disso, a pilocarpina possui uma propriedade que estimula a produção de saliva, por isso tem sido explorada no tratamento da xerostomia (boca seca) causada pela radioterapia ou quimioterapia nos cânceres de cabeça e pescoço (SANTOS; MORENO, 2004).

Em espécies de *Pilocarpus* encontram-se diversas cumarinas que vão desde as mais simples, como escopolentina, até as mais complexas (SANTOS et al., 2004). Esse composto tem apresentado excelentes resultados como inibidores de germinação (MACÍAS et al., 1993), inseticida (CALCAGNO et al., 2002), antioxidante (SHAW et al., 2003) e contra a doença de Chagas (PAVÃO et al., 2002; MAFEZO LI et al., 2000). Estudos realizados por Huang et al., (1994) afirmam que cumarinas sintéticas possuem eficiente atividade contra o HIV.

Além dos compostos citados, existem outros que ocorrem em apenas algumas espécies de *Pilocarpus*, os quais podem citar lignanos, hidrocarbonetos, amidas, ácidos carboxílicos, ésteres e cetonas (SANTOS et al., 2004).

## 2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Várias espécies de plantas ricas em óleos essenciais, normalmente possuem atividade antimicrobiana, onde seu principal composto isolado são os terpenos, seus derivados oxigenados e os terpenoides (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2011). A presença ou não dessa atividade está relacionada com alguns fatores, como a quantidade dos componentes, a espécie e a concentração do óleo essencial, havendo também relação com o microrganismo, à metodologia utilizada e até a condição de armazenamento (MARINO et al., 2001).

Na literatura existem estudos com diversos componentes de óleos essenciais, como timol, carvacrol, safrol, em que foi possível observar que há um sinergismo entre estes componentes, sendo assim responsáveis pelas características desses óleos, como fragrância, textura, atração lipofílica e penetração celular. Porém, é mais significativo realizar estudo do óleo por completo ao invés de um ou dois componentes (BAKKALI et al., 2008). Entretanto, Ohno et al. (2003), afirmam que deve-se estudar os componentes separados e juntos para investigar se sua ação antibacteriana é oriunda do conjunto ou por um componente sozinho.

Os óleos essenciais podem atuar também em sinergismos com alguns antibióticos (PROBST, 2012). Foi demonstrado por Jedlickova (1992) que a combinação de alguns componentes do óleo com antibióticos conseguiu inibir o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp* e *Pseudomonas spp*.

Por meio da técnica de poços realizada por Knezevic et al. (2016) foi possível identificar qual componente possuía maior atividade antimicrobiana do óleo essencial *Eucalyptus camaladulensis*.

Os óleos e seus componentes possuem caráter lipofílico o qual permite que haja interação com a bicamada fosfolipídica da membrana bacteriana, conseguindo assim deixá-la mais permeável, havendo a liberação de íons e redução do potencial de membrana (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

Contudo, têm-se realizado estudos para analisar a ação de terpenos. Onde se pôde observar que a classe de monoterpenos interage com o potencial de ação e a inibição da cadeia respiratória (D. KALEMBA; A. KUNICKA, 2003; GREAY; HAMMER, 2011). Segundo Qiu et al. (2011) quando a bactéria *Staphylococcus aureus* é exposta a terpenos do óleo essencial da *Perilla* (*Perilla frutescens*), existe uma interação com os genes que codificam os fatores de virulência da mesma. Para analisar a atividade antimicrobiana é comumente encontrada à utilização de espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, especificamente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (BERTINI et al., 2005; KNEZEVIC et al., 2016), ou utilizam-se bactérias relacionadas a uma doença específica (LESJAK et al., 2015),

Segundo Dorman e Deans (2000) as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos componentes dos óleos essenciais quando comparadas às Gram-negativas. Esse fenômeno pode ser explicado pela presença de uma parede externa nas bactérias Gram-negativas, levando-a ser resistente (RATLEDGE; WILKINSON, 1988). Porém nem todos os estudos comprovam essa sensibilidade (WILKINSON et al., 2003).

Existem algumas técnicas que visam à detecção da ação dessa atividade, sendo normalmente utilizado o método de diluição em ágar, em que esta técnica é utilizada para analisar a atividade de antibióticos contra microrganismos (D. KALEMBA; A. KUNICKA, 2003).

## 2.7 CÉLULAS TUMORAIS E CÂNCER

A constituição, integridade e função dos tecidos se devem ao equilíbrio existente entre proliferação e morte celular. Os organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem para que possam se desenvolver normalmente. No período embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos. Tal equilíbrio é mantido por meio da

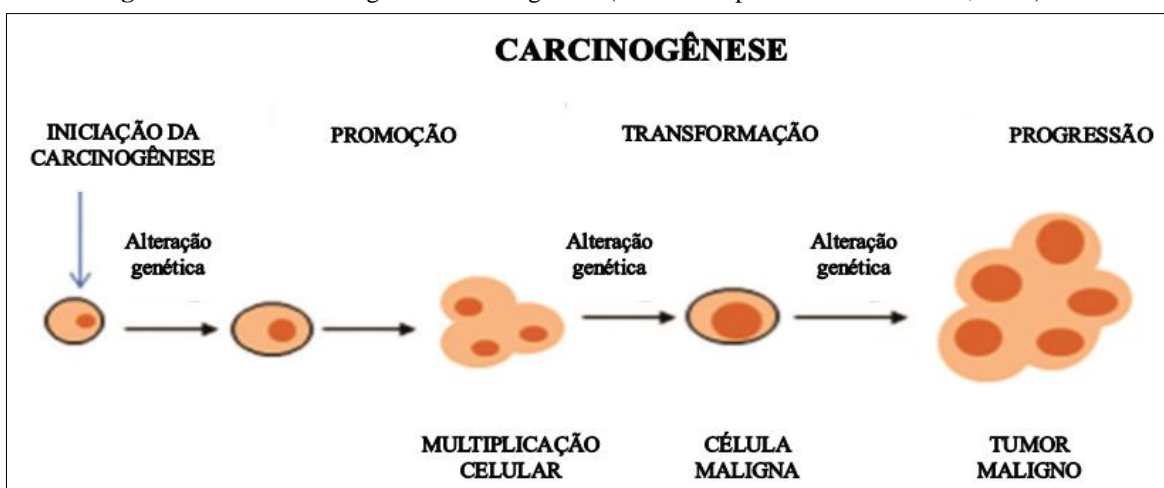


interação entre dois sistemas de sinalização, intracelular e extracelular. Quando, por algum motivo, ocorre um desequilíbrio, as células passam a se proliferar desordenadamente formando a massa tumoral (FERREIRA; ROCHA, 2004; GRIVICICH et al., 2007).

Câncer pode ser entendido como uma doença genética baseada em células, através da qual as mutações do DNA causam proliferação celular descontrolada. A explicação dos fenótipos de câncer baseia-se nas premissas adotadas pela teoria da mutação somática (SMT) e suas variantes centradas na célula (DOUGLAS HANAHAN; ROBERT A. WEINBERG, 2011).

. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, o que causa milhões de mortes anualmente em todo o mundo. Trata-se de uma patologia de origem multifatorial, ou seja, causado por fatores externos, inerente aos hábitos do indivíduo, e/ou fatores internos, geneticamente pré-determinados, podendo haver interação entre esses fatores para o desenvolvimento da doença. Mesmo diante de constantes avanços no estudo desta patologia, ela continua sendo uma das principais causas de morte tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, por conta disso, é considerado um importante problema de saúde pública em todo o mundo (INCA, 2015).

**Figura 6.** Diferentes estágios da carcinogênese (Fonte: Adaptado de KAUR et al., 2014).



Durante o processo de progressão tumoral, algumas células podem perder a capacidade de adesão e se desprender do tumor primário, posteriormente invadir a membrana basal do tecido e produzir enzimas proteolíticas, as quais irão facilitar a entrada

da célula tumoral na circulação sanguínea, onde essa célula irá migrar para outros pontos do corpo e se proliferar, em um processo chamado de metástase, que é responsável por mais de 90% das mortes por câncer (FERREIRA E ROCHA, 2004; WIRTZ et al., 2011).

A análise morfológica das células e avaliações das alterações bioquímicas induzidas encontradas nas células tumorais é de grande importância para definir alvos específicos de novos agentes antitumorais. Desta forma, a pesquisa de novos agentes antitumorais é geralmente pautada nas modificações morfológicas e bioquímicas induzidas pelo novo agente em comparação às células não tratadas tumorais e às células normais, para isso, os testes *in vitro* têm sido amplamente utilizados. Os métodos mais empregados na investigação antitumoral são os ensaios de citotoxicidade em cultura de células, para avaliação da atividade anticâncer dos compostos testados. A citotoxicidade dos compostos é avaliada por parâmetros que incluem, desde morte, até alteração de metabolismo celular (HOUGHTON et al., 2007).

Os eventos de morte celular podem ser ou não processos passivos. Cada tipo de morte celular é caracterizado por um conjunto de alterações bioquímicas e morfológicas. De acordo com essas alterações, os processos de morte celular podem ser classificados em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência. Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na iniciação tumoral (GRIVICICH et al., 2007).

Estudos apontam a apoptose e autofagia como sendo ambos os caminhos para supressão tumorais. A apoptose tem como função impedir a sobrevivência de células cancerosas enquanto que a autofagia possui o papel de facilitar a degradação de moléculas oncogênicas, auxiliando na prevenção do desenvolvimento do câncer. Portanto, defeitos na autofagia ou apoptose podem levar ao câncer (SU et al., 2013).

A apoptose, ou morte celular programada, é um fenômeno biológico que, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, inclusive o câncer. Estudos mostram que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular. Trata-se de um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, imprescindível para a eliminação de células sem utilidade ou defeituosas. Durante esse processo, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular, como a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação

internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. A compreensão dos mecanismos apoptóticos permite o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer. Tais estratégias encontram base na indução da morte das células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (GRIVICICH et al., 2007).

A autofagia é uma via de degradação celular, indispensável para o processo de homeostase no organismo. Ela envolve a degradação seletiva dos componentes celulares, incluindo proteínas de longa duração, agregados de proteínas, organelas citoplasmáticas danificadas e patógenos intracelulares, resultando na reciclagem de nutrientes e na geração de energia. Mas ela aparenta ter função dupla no câncer, visto que, segundo alguns estudos, ela também pode facilitar a sobrevivência de células tumorais através do fornecimento de nutrientes a células com deficiência nutricional por meio de degradação de componentes celulares. (LIU et al., 2013; RAMAKRISHNAN; GABRILOVICH, 2013; SU et al., 2013). Por conta disso, estudos estão sendo direcionados principalmente na identificação de reguladores críticos que possam controlar a autofagia, visto que, a inibição desses reguladores levaria a maior eficiência no processo de morte celular e converteria uma resposta de sobrevivência celular em um processo de morte (AMARAVADI; THOMPSON, 2007).

As estimativas mundiais de novos casos de câncer continuam aumentando significativamente. Para o Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA, 2015).

Tendo em vista essas altas taxas de incidência, diversos e constantes esforços vêm sendo realizados afim de que se possa desenvolver e aperfeiçoar terapias antineoplásicas. Atualmente as formas de tratamento mais utilizadas podem ser sistêmicas (quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia) ou locais (cirurgia e radioterapia), as quais geralmente são utilizadas de forma combinada com o intuito de erradicar a doença (MA, 2009).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, a maior parte dos fármacos utilizados no tratamento contra o câncer, aprovadas entre 1940 e 2006, são oriundas de produtos naturais ou adquiridas por meio de estudos dos mecanismos de ação de produtos naturais (EFFERTH, 2010).

## 2.8 ATIVIDADES DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS.

Grandes esforços estão sendo direcionados em busca de novos princípios que extinguem ou amenizem vários tipos de neoplasias nos diversos tecidos humanos, os óleos essenciais de algumas plantas são citados em estudos como promissores na erradicação de tumores. VALLILO 2006 e colaboradores verificaram efeitos benéficos do D- Limoneno ( $C_{10}H_{16}$ ) extraído do óleo essencial do *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) na quimioterapia de tumores malignos de próstata, pâncreas e mama induzido em roedores. O geraniol encontrado em alguns óleos essenciais, apresentou potencial na inibição de células de câncer de cólon por meio dos canais iônicos e passagens de sinais (MACHADO, B. F. M. T. et al., 2011). O óleo essencial de *Ageratum conyzoides* que é rico em terpenos, foi testado quanto ao seu potencial antineoplásico em o tumor ascítico de Ehrlich em camundongos, em que houve uma diminuição do crescimento tumoral quando foi utilizado doses de 100 mg/Kg ( MOMESSO, L.S, 2008). Foram feitos teste antitumoral *in vitro* e *in vivo* de linhagens humanas K562 utilizando óleo essencial da *Lippia Microphylla* que constaram que o mesmo apresentou minimização do tumor e que sua baixa citotoxicidade não é um fator limitante para sua possível aplicabilidade terapêutica (XAVIER, A. L, 2011).

O desenvolvimento de novos fármacos requer uma investigação minuciosa da eficácia e segurança. O potencial de risco e benefício das substâncias deve ser cuidadosamente considerado, de modo que os benefícios do uso da nova molécula superem os efeitos colaterais (VARANDA, 2006). Tendo isso em vista, o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais tem como objetivo produzir agentes mais eficazes, potentes, menos tóxicos e, principalmente, seletivos a células tumorais. Espera-se que a atividade citotóxica dos fármacos exerça ação especificamente contra essas células, entretanto, o que se tem na clínica oncológica atualmente, com raras exceções, são agentes que apresentam baixa seletividade, e possuem elevada citotoxicidade a células e tecidos com alto potencial

mitótico, o que significa atingir tanto as células tumorais quanto tecidos normais (RIBEIRO, J.N., et al. 2005).

## 2.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são espécies químicas produzidas naturalmente pelo metabolismo energético dos seres humanos, estas espécies são extremamente reativas. Os radicais livres são constituídos genericamente de moléculas, átomos ou íons que apresentam elétrons desemparelhados em seus orbitais, na maioria das vezes o oxigênio faz parte composição elementar dessas espécies reativas, mas também existem espécies que apresentam o elemento nitrogênio (MIRANDA, C. A. S. F. et al., 2016).

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) podem apresenta-se na forma de radical superóxido( $O_2^{2-}$ ) obtido pela da redução do oxigênio molecular por um elétron, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) obtido pela da redução do oxigênio molecular por dois elétron , radical Hidroxil obtido pela da redução do oxigênio molecular por três elétron, radical Alcoxil ( $RO^\bullet$ ) substância orgânica centrada no oxigênio, radical Peroxil ( $RO_2^\bullet$ ) formado pelos peróxidos orgânicos e oxigênio molecular singlet uma forma excitada de oxigênio molecular que não possui elétrons desemparelhados em sua última camada formando por uma inversão de spin do oxigênio molecular (RIBEIRO, S. M. R., et al., 2005).

As espécies reativas de nitrogênio (ERN's) existem principalmente por meio das substâncias Oxido Nítrico (NO) e Peroxinitrito ( $NO_3^-$ ). O oxido nítrico está presente em grande abundancia em sistemas biológicos e quando em excesso pode causar redução da motilidade, da viabilidade espermática e conseqüentemente da fertilidade. O Peroxinitrito é obtido pela reação entre o Oxido Nítrico e o ânion superóxido é responsável por causar diversos transtornos às moléculas biológicas (SILVA, E. C. B., et al., 2010).

As ERO'S assim como as ERN'S são gerados endogenamente como resultado do metabolismo de oxigênio, também são gerados em situações não-fisiológicas, como por exemplo, a exposição das células a xenobióticos. Esses radicais quando em desequilíbrio nas células podem desencadear o que é denominado estresse oxidativo (FERREIRA A.L.A., e MATSUBARA, L.S, 1997), que é decorrente da produção excessiva de radicais livres. Quando estes radicais atingem biomoléculas, estas vêm a sofrer oxidação e perda de suas funções. A cronicidade do processo em questão pode desencadear doenças como

aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (BARBOSA, K. B. F, 2010).

As espécies antioxidantes são conceituadas como as que são capazes de reduzir a oxidação de um substrato que está em determinado meio em concentração superior a sua. Estes sofrem a oxidação que o substrato deveria sofrer, fazendo assim com que o substrato continue intacto da ação dos radicais livres. Assim agentes antioxidantes podem retardar ou diminuir a oxidação de Biomoléculas. Os antioxidantes agem sobre os radicais livres, esta ação acontece principalmente por meio da quelação do oxigênio singlete e triplete ou decomposição de peróxidos, estes processos são decorrentes de reações de oxirredução (DEGÁSPARI, C. H. et al., 2004).

O organismo produz um conjunto de substâncias responsáveis pela defesa contra os radicais livres (ERO's e ERN's), dentre as quais podemos citar glutatona, a superóxido dismutase, a catalase, a glutatona peroxidase e a N-acetilcisteína, além dessas, o organismo pode contar com fontes exógenas para suplementar a necessidade por essas substâncias em que as principais são o ácido ascórbico (vitamina C), os flavonoides, o  $\beta$ -caroteno, o  $\alpha$ -tocoferol, o zinco, o manganês, o cobre e o selênio. Os alimentos que fornecem esses nutrientes antioxidantes indispensáveis a prevenção de diversas doenças deve ser ingeridos continuamente, uma vez que são rapidamente metabolizados pelo organismo (ZIMMERMANN, A. M. et al., 2008).

O mercado que tem os produtos naturais como matéria prima para o desenvolvimento de fármacos, está em constante ascensão, pois estes têm se mostrado eficientes contra diversas enfermidades por meio da sua diversidade estrutural de suas substâncias. Uma das propriedades mostradas por estas substâncias está em seu potencial em minimizar o efeito de moléculas que apresentam efeitos oxidantes sobre proteínas, ácidos graxos e biomoléculas em geral. A indústria alimentícia também evoluiu positivamente em virtude da utilização desses compostos que inibem a oxidação dos alimentos, fazendo com que estes disponham de um período maior antes que venham sofrer deterioração (GALVÃO, E. L. et al., 2008).

Estudos evidenciam o grupo dos óleos essenciais como promissores agentes antioxidantes, como exemplo, temos estudos realizados com óleo essencial do *Caryophyllus aromaticus* L. (Cravo da Índia) avaliado pelo método de DPPH que apresentou elevada ação antioxidante (SCHERER, R., 2009), foi avaliado também o potencial antioxidante de *C. nardus* (Citronela) através do método DPPH os valores de  $CI_{50}$  encontrados foram de 517,40

$\mu\text{g mL}^{-1}$ . É possível encontrar na literatura, vários outros trabalhos que corroboram com essa perspectiva (ANDRADE M. A., 2012).

## 2.10 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os fungos também conhecidos como mofos ou bolores podem influenciar de diversas formas na sociedade por meio das reações químicas que promovem. O uso dos fungos pelos seres humanos é diversificado, no ramo da biotecnologia podem ser direcionados para vários segmentos; como na indústria farmacêutica, indústria de alimentos fermentados, bebidas alcoólicas, produção agrícola e também interfere em prol do equilíbrio do meio ambiente (ABREU, J.A.S. et al., 2015).

No entanto nos seres humanos uma classe de fungos denominada dematiáceos podem acometer a pele e tecidos subcutâneos ocasionando a cromoblastomicose que é uma infecção crônica em que o fungo se implanta por algum traumatismo na pele (RACHEL B. C. et al., 2011). Além do mais, estudo aponta os fungos *Alternaria* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Pythium* sp. e *Rhizoctonia* sp. *Trichoderma* sp., como potenciais agentes contaminantes de frutos e semente de plantas florestais (SANTOS F. E. M. et al., 2001).

A *candida* está presente nos seres humanos imunocompetentes e vivem em comensalismo com as mucosas gastrintestinais (IVETE C. C. et al., 2008). Há relatos desde a época de Sócrates que apontam fungos do tipo candida como causadores de diversas infecções em pacientes debilitados, por exemplo, a endoftalmite fúngica apresenta-se na grande maioria dos casos como uma infecção de caráter indolente. Os sintomas encontrados na infecção intra-ocular por *Candida* podem ser embaçamento visual, dor e fotofobia (SERRACARBASSA P. D. et al., 2003).

A meningite é um processo inflamatório que atinge os epitélios cerebrais, esta pode ser causada por bactérias, vírus e fungos. As causadas por fungos são as mais difíceis de serem contraídas, no entanto seu tratamento deve ser feito rapidamente para não deixar sequelas. A meningite criptocócica é a mais comum dentre as causadas por fungos, a espécie responsável é *Cryptococcus neoformans* (MORAES M. F et al., 2013).

Podemos perceber que os fungos são causadores de diversas patologias tanto em animais como em vegetais, portanto a busca de novos medicamentos está sendo dirigida para a descoberta de princípios ativos menos tóxicos de origem natural. Os óleos essenciais

tem se mostrado promissores nesse aspecto, estudos apontam que o óleo essencial do orégano pode inibir o crescimento micelial de fungos patogênicos do arroz (ZANANDREA, I. et al., 2004). Na literatura é possível encontramos diversos trabalhos que mostram os óleos essenciais como combatentes de fungos nocivos a saúde, os óleos extraídos de *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus limon*, *eucalipto-citriodora*, *Eugenia uniflora*, *Peumus boldus* e *Rosmarinus officinalis* também já se mostraram eficientes contra alguns tipos de cepas fúngicas *Candida albicans* (LIMA I. O. et al., 2006).

Este trabalho busca por mais alternativas para o tratamento e prevenção de patologias. Frente ao grande leque de Biodiversidade que encontram-se em nosso País e a crescente necessidade por novos princípios ativos capazes de melhorar a qualidade de vida de nossa população faz-se de extrema importância o desenvolvimento de mais estudo nesta área.

Os radicais livres são apontados em alguns estudos como causadores de diversas disfunções crônicas de nosso organismo (Barbosa K. B. F., 2010), associando a isso o fato de diversos óleos essenciais terem se mostrado eficientes agentes antioxidantes, este trabalho centra também seu foco de estudo na avaliação antioxidante dos óleos essenciais da planta em questão. Para finalizar a avaliação fitoquímica desses óleos neste trabalho ainda é investigada a atividade antibacteriana e antifúngica dos mesmos. Dessa maneira a uma contribuição para trabalhos de aprofundamento posteriores nessa linha de pesquisa.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil fitoquímico do óleo essencial extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus* bem como avaliar sua atividade antibacteriana, citotóxica, antioxidante e antifúngica em ensaios *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extrair o óleo essencial das folhas de *Pilocarpus microphyllus* através da técnica de arraste a vapor.

Identificar os compostos químicos do óleo segundo a técnica de espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa (EM-CG).

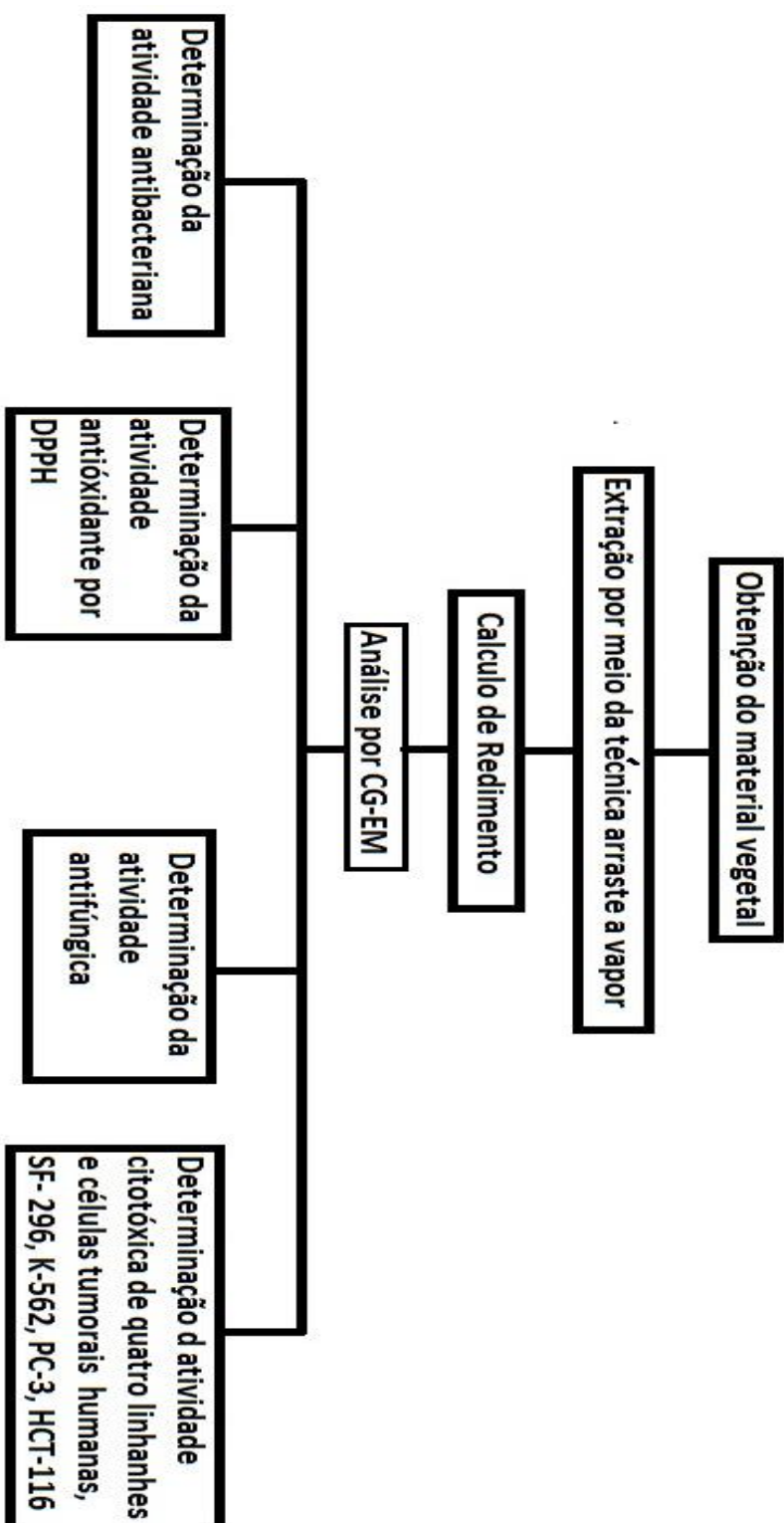
Verificar atividade antibacteriana do óleo essencial pelo método de diluição em ágar.

Verificar a citotoxicidade do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* por meio de ensaios *in vitro* em quatro linhagens de células tumorais humanas.

Verificar a atividade antioxidante do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* pelo método DPPH.

Avaliar da atividade antifúngica dos óleos de folhas secas e frescas de *Pilocarpus microphyllus* por meio da técnica de microdiluição em caldo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS



#### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*

O material vegetal foi fornecido pelo laboratório da empresa Phytobios em parceria com a Universidade Federal do Piauí. Empresa que faz parte do grupo CENTROFLORA fica localizada nas margens dos tabuleiros litorâneos na cidade de Parnaíba que está a aproximadamente 350 km da capital do estado do Piauí sentido norte.

A extração do óleo aconteceu no laboratório da empresa Phytobios e os demais procedimentos de separação e análise foram realizados no laboratório de biotecnologia da UFPI (BIOTEC) onde funciona o programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Foram coletados 6,4 Kg de folhas frescas de *Pilocarpus microphyllus* as mesmas foram lavadas com água destilada, em seguida colocadas dentro do aparelho de arraste de vapor (Linax), este aparelho usa dos mesmos mecanismos empregado pela usual vidraria de Clevenger, o qual é dividido em dois compartimentos separados por uma chapa perfurada. A parte inferior do Linax foi ocupada com água e sua parte superior ocupada com as folhas do *Pilocarpus microphyllus*. Na base do aparelho foi colocada uma fonte de calor, o qual é responsável pelo aquecimento da água que se encontra no interior do aparelho e posterior formação de vapor. O vapor gerado se movimenta em direção ao material vegetal que por sua vez tem seus componentes mais voláteis arrastados junto com as moléculas gasosas de água, esta emulsão se difunde até o condensador e por fim ao recipiente coletor. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção do óleo essencial a partir 4,5 Kg de folhas secas. O material obtido foi envasado em frasco âmbar e armazenados em ambiente refrigerado.

#### 4.2 ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*

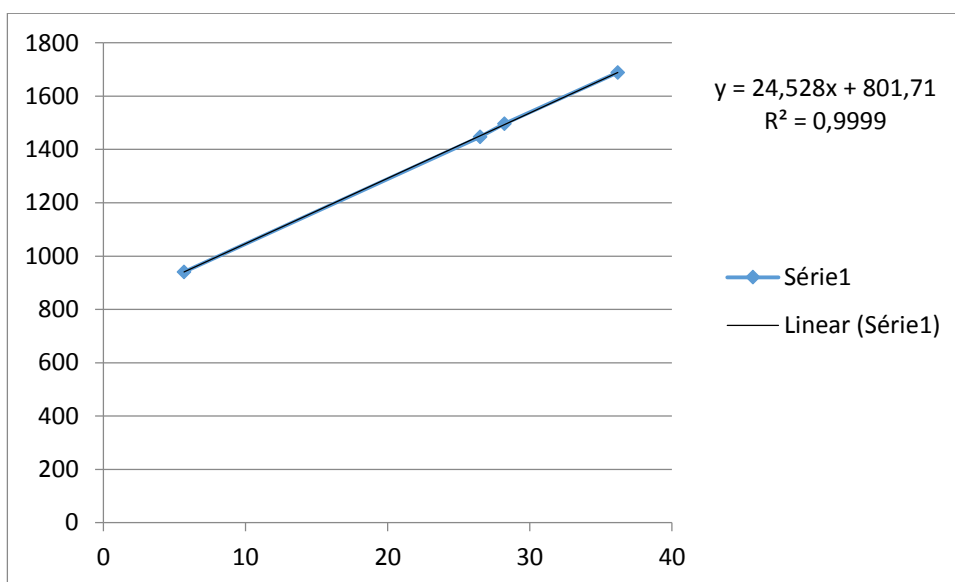
A análise química foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foram realizadas em sistema GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 (Shimadzu) equipado com coluna Rxi-5HT (30 m x 0,25mm x 0,25  $\mu$ m) com fase estacionária com 5% de difenil dimetilpolissiloxano. Uma alíquota de 1  $\mu$ L de solução da amostra (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi injetada no modo *split* (1:100), tendo hélio como gás de arraste em fluxo de 1,02 mL min<sup>-1</sup> e temperaturas de injeção de 220 °C, fonte de íons em 250 °C e interface em 240 °C. A temperatura inicial do forno do CG era 60 °C e foi aumentando até 246 °C em uma taxa de 3 °C. min<sup>-1</sup>. O espectrômetro de massa com analisador quadrupolo

foi operado com ionização por elétrons (IE) a 70 eV, detector a 290 °C, tempo de corte do solvente de 3 min e faixa de varredura de massas de 47-500 Da. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas computacionais Wiley 229 e bibliografia

Os índices de Kovats (IK) foram corrigidos por meio de uma regressão linear, feita com a utilização do IK tabelados de quatro componentes de grande taxa de similaridade presentes na amostra (Alfa pineno, Trans-beta-omiceno, Trans-cariofileno, tridecanona).

. A regressão feita com a utilização do software Microsoft Excel deu resultado como o (gráfico 1), o qual é definido de acordo com a função(  $y = 24,528x + 801,71$ ) que obtém o IK em função do tempo de retenção.

**Gráfico 1.** Gráfico da Linearidade



Os índices de Kovats padrão foram adquiridos da base de dados do governo, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. É válido ressaltar que foi levado em consideração o tipo de coluna usada na análise.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A técnica utilizada foi a de diluição em ágar por meio de poços no ágar Mueller Hinton, conforme atualizações do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2009), com adaptação. Foram realizados três orifícios de 6mm de diâmetro no meio com auxílio de molde formando os poços (DE BONA, 2014). Foram testadas duas espécies de

bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* onde foram inoculadas por meio de um swab estéril no meio, posteriormente foi adicionada 20 µL de concentração 20µg.mL<sup>-1</sup> dissolvido em DMSO do óleo essencial do *Pilocarpus microphyllus* nos poços. Em seguida as placas foram incubadas a temperatura de 35 ° C por 24 horas (DE BONA, 2014). Após o tempo estipulado foi medido o diâmetro dos halos formados com ajuda de um paquímetro (BERTINI et al., 2005), e foram classificados como: sensíveis, quando o diâmetro do halo foi maior que 3 mm e resistentes com diâmetro igual ou menor que 2mm (KARAMAN et al., 2003). Esse procedimento foi realizado utilizando óleo essencial obtido das folhas frescas e o óleo essencial obtido das folhas secas *Pilocarpus microphyllus*.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

Para a determinação da atividade antitumoral, foram utilizadas quatro linhagens de células tumorais humanas, SF-295 (glioblastoma), K-562 (leucemia mielóide crônica), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) e HCT-116 (carcinoma colorretal). As quais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras utilizadas foram diluídas em DMSO puro estéril.

Análise de citotoxicidade pelo método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) vem sendo utilizada no programa de screening do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As células tumorais foram plaqueadas nas concentrações de 0,3 x 10<sup>6</sup> cél/mL para a linhagem K-562; 0,1 x 10<sup>6</sup> cél/mL para as linhagens PC-3 e SF-295 e 0,7 x 10<sup>5</sup> cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL

de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Inicialmente, as amostras foram testadas em concentração única. Foram testadas em concentrações seriadas e o valor de  $CI_{50}$  foi calculado. Esse procedimento foi realizado utilizando óleo essencial obtido das folhas frescas e o óleo essencial obtido das folhas secas *Pilocarpus microphyllus*.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade sequestradora de radicais livres DPPH, do óleo essencial folhas da espécie *Pilocarpus microphyllus*, foi avaliada de acordo com o método descrito por Kamdem et al. (2013), com modificações. 160  $\mu$ L do óleo (10-400  $\mu$ g/ mL) foram misturados com 830  $\mu$ L de DPPH a 0,3 mM em etanol. A mistura foi mantida em repouso à temperatura ambiente durante 30 min no escuro. Soluções do branco foram preparadas com cada amostra de teste (170  $\mu$ L) e 830  $\mu$ L de água. O controle negativo foi de 830  $\mu$ L de 0,3 mM DPPH com 170  $\mu$ L de água, enquanto que o ácido ascórbico (10-400  $\mu$ g / mL) foi utilizado como controle positivo.

A absorvância foi medida a 517 nm usando espectrofotômetro. A atividade antioxidante dos compostos é expressa em porcentagem de redução do DPPH obtida pela equação abaixo os resultados serão apresentados em Concentração Efetiva 50% ( $CE_{50}$ ).

$$\text{Inibição}\% = 100 - [(A_{\text{controle (-)}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle (-)}}] \times 100$$

Em que:

$A_{\text{controle (-)}}$  = absorvância da solução de DPPH sem a amostra;

$A_{\text{amostra}}$  = absorvância da amostra com o DPPH.

O valor de  $CI_{50}$ , definido como a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, foi calculado através de regressão linear do gráfico de porcentagem de inibição do DPPH (eixo Y) versus concentração dos extratos (eixo X). Para a obtenção da  $CI_{50}$ , foram plotados gráficos como os valores de inibição percentual da degradação do DPPH versus as concentrações analisadas. Para fins de comparação foram testados ácido ascórbico, por possuírem atividade antioxidante reconhecida. As curvas analíticas dos padrões foram construídas utilizando-se as mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

#### 4.6 AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA

O fármaco utilizado como controle foi a anfotericina B (Sigma-Aldrich®), o qual é o padrão-ouro para tratamento de infecções por *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*.

Três diferentes cepas de *Candida* spp. (*Candida albicans* ATCC 10234 , *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258) e duas cepas de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32268 e ATCC 24066) foram utilizadas no experimento. Todas as cepas de *Candida* utilizadas nesse estudo foram fornecidas pela micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal do Piauí (CMRV). As cepas de *Candida* spp. E *Cryptococcus neoformans* foram inoculadas em Ágar Sabouraud e incubadas a 35 °C por 24h e 48h, respectivamente. Em solução salina 0,85%, foi adicionada uma alçada de micro-organismo e a solução obtida foi padronizada em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 530 nm, em 90% T. Essa suspensão foi diluída na proporção de 1:50 e, posteriormente, 1:20 em meio RPMI- 1640 tamponado com MOPS (CLSI, 2008).

A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliação da atividade antifúngica dos óleos de folhas secas e frescas de *Pilocarpus microphyllus*. O procedimento foi realizado com base no protocolo M27-A3 do CLSI, o qual é o protocolo padrão para avaliação de suscetibilidade de leveduras (CLSI, 2008). A faixa de concentração avaliada para os óleos foi de 0,097 a 5µL/mL. Para a anfotericina B foi utilizada a faixa de concentração de 0,03 a 16µg/mL. As placas de 96 poços empregadas nos testes foram incubadas a 35°C por 48h em estufa. Após esta etapa foi realizada a leitura visual, e deste modo, determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). A CIM é a menor concentração do produto avaliado capaz de inibir totalmente o crescimento fúngico. Foram determinadas, para tratamentos em que não foi possível obter a CIM, as concentrações capazes de reduzir o crescimento fúngico, com relação ao controle de crescimento, em 50% (CIM<sub>50</sub>) e 90% (CIM<sub>90</sub>). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RENDIMENTO M/M DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO

Na extração do óleo das folhas frescas foram utilizados 6400g de material vegetal, foi necessário 72 min para que a primeira porção do óleo pudesse ser coletada. No tempo de 272 min registrou-se que a quantidade de óleo coletada foi de 10,5g e que a partir desse tempo à quantidade de óleo coletada foi significativamente reduzida. Nessas condições o rendimento m/m calculado foi de 0,16 %.

Na extração do óleo das folhas secas foram utilizados, 4500 g de material vegetal, foi necessário 84 min para que a primeira porção do óleo pudesse ser coletada. No tempo de 300 min registrou-se que a quantidade de óleo coletada foi de 12,12g e que a parti desse tempo à quantidade de óleo coletada foi significativamente reduzida. Nessas condições o rendimento m/m calculado foi de 0,27 %.

O cálculo do rendimento foi realizado através da equação abaixo:

$$R(\%) = R(\%) = \frac{M_{\text{óleo}}}{M_{\text{planta}}} \times 100$$

Onde:

R(%) = rendimento da produção do óleo essencial

M<sub>óleo</sub> = massa do óleo obtida (em g)

M<sub>planta</sub> = massa das folhas

**Tabela 1.** Rendimento da extração do óleo para folhas secas e folhas frescas.

	<b>Tempo de obtenção da primeira porção</b>	<b>Tempo final da extração</b>	<b>Massa de material vegetal utilizada</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Folhas frescas</b>	72 min	272 min	6400 g	0,16 %
<b>Folhas secas</b>	84 min	300 min	4500 g	0,27 %

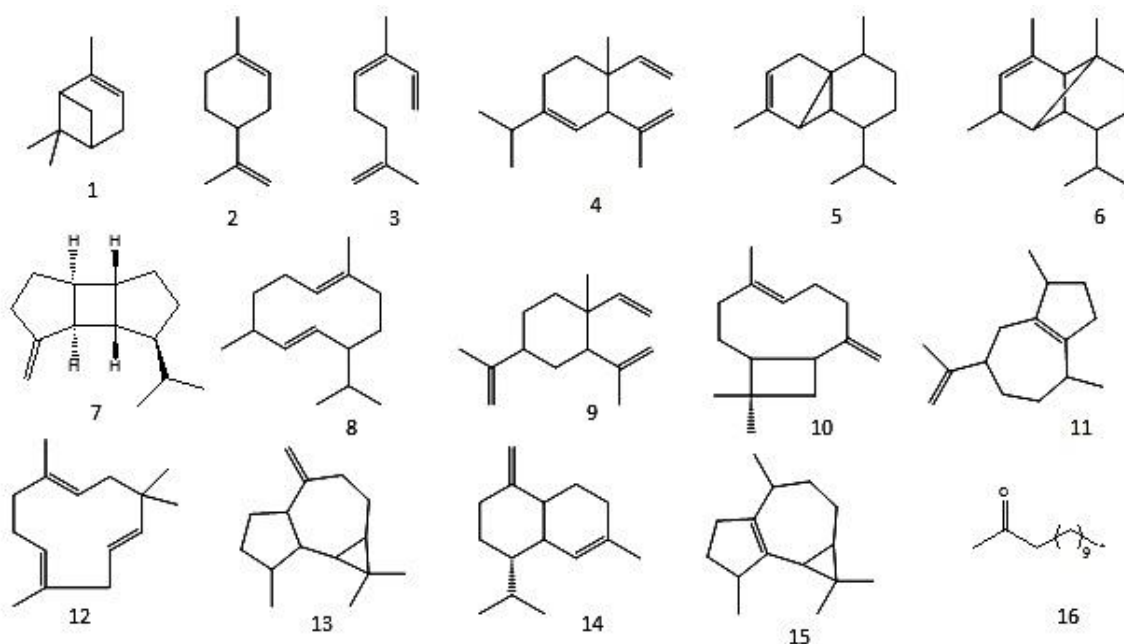


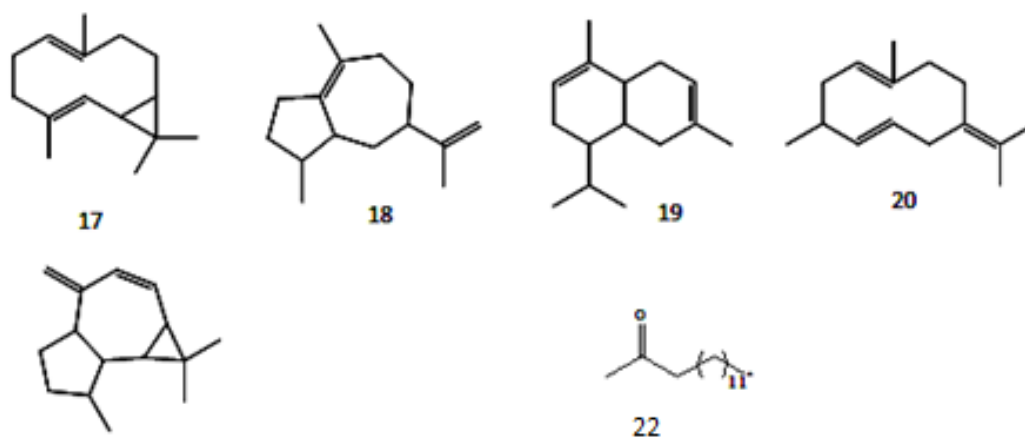
## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*

Para conhecer a composição dos óleos essenciais é utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massa (CG-EM) (BAKKALI et al., 2008; BERTINI et al., 2005).

Através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa, detectou-se 24 picos referentes a 24 compostos presentes nos óleos essenciais de *Pilocarpus microphyllus*, dentre os quais encontramos monoterpenos e sesquiterpenos, as formulas estruturais estão apresentadas abaixo.

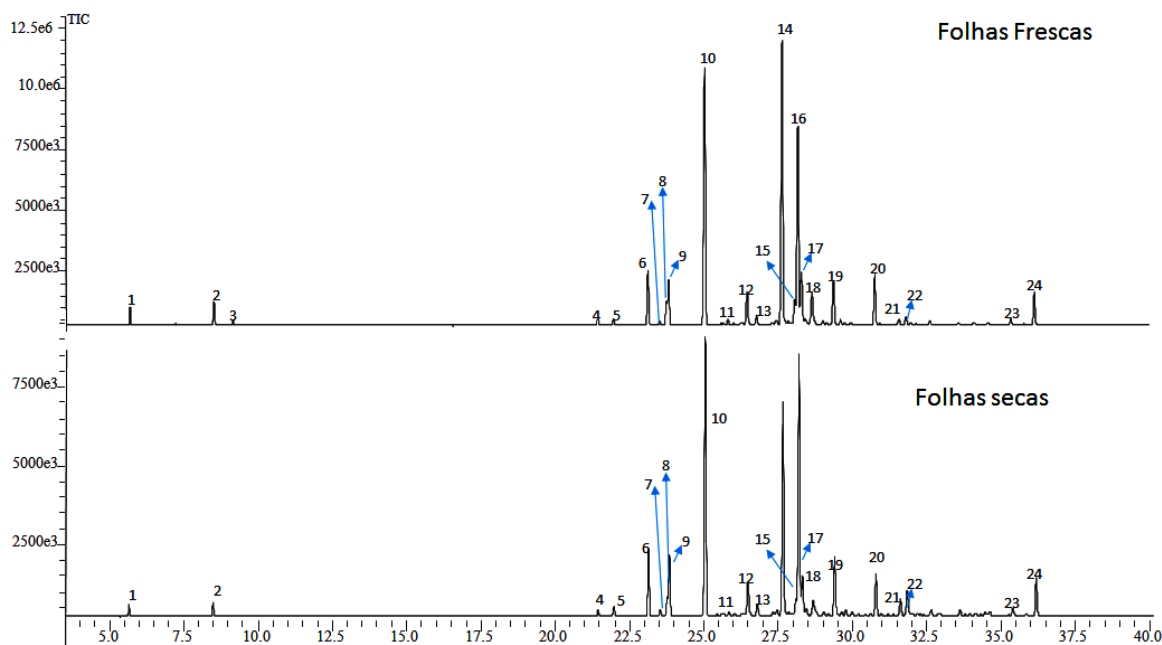
**Figura 7.** Estrutura dos compostos identificados no óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus*. (1) Alfa pineno, (2) limoneno, (3) trans-beta-omiceno, (4) delta eleneno, (5) alfa cubeneno, (6) alfa copaeno, (7) beta bourboneno, (8) germacreno D, (9) beta elemeno, (10) trans-coriofileno, (11) alfa gaieno, (12) alfa humuleno, (13) aromadendreno, (14) gama cadineno, (15) isoleveno, (16) tridecanona, (17) biciclogermacreno, (18) delta guaieno, (19) beta cadineno, (20) Germacreno B, (21) Dehidroaromadendreno, (22) beta guaieno, (23) beta guaineno, (24) pentanodec-2-ona.





Por meio do cromatograma representado abaixo foi possível observar que a Pentanodec-2-ona ( 36,18 min) e  $\alpha$ -pineno ( 5,67 min) tem maior e menor tempo de retenção respectivamente. Observou-se também que o conjunto de compostos monoterpênicos (1), (2) e (3) mostraram maior afinidade pela fase móvel, onde  $\alpha$ -pineno, limoneno e trans- $\beta$ -omiceno tiveram picos com períodos de retenção relativamente pequenos.

**Figura 8.** Cromatograma referente ao tempo de retenção dos compostos identificados.



Revelou-se que o óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* tem quantidade majoritária dos componentes  $\gamma$ -cadineno (14) a 23,53% seguido de trans-cariofileno (10) 21,43% e tridecanona (16) 16,15%.

**Tabela 2.** Lista de compostos identificados com seus respectivos índices de Kovats, tempos de retenção, similaridade e média da abundância relativa e desvio padrão.

<b>Pico</b>	<b>IK</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>Substância identificada</b>	<b>Média da Abundância relativa e desvio padrão relativo</b>
<b>1</b>	941	5,67	$\alpha$ -pineno	0,80 $\pm$ 0,01
<b>2</b>	1010	8,50	Limoneno	1,45 $\pm$ 0,02
<b>3</b>	1026	9,15	Trans- $\beta$ -omiceno	0,30 $\pm$ 0,01
<b>4</b>	1328	21,45	$\delta$ -elemeno	0,49 $\pm$ 0,01
<b>5</b>	1341	21,98	$\alpha$ -cubeneno	0,53 $\pm$ 0,01
<b>6</b>	1370	23,15	$\alpha$ -copaeno	4,25 $\pm$ 0,01
<b>7</b>	1379	23,54	$\beta$ -bourboneno	0,35 $\pm$ 0,01
<b>8</b>	1385	23,77	Germancreno D	1,70 $\pm$ 0,04
<b>9</b>	1386	23,84	$\beta$ -elemeno	3,59 $\pm$ 0,05
<b>10</b>	1416	25,06	Trans-cariofileno	21,43 $\pm$ 0,04
<b>11</b>	1436	25,84	$\alpha$ -guaieno	0,42 $\pm$ 0,01
<b>12</b>	1448	26,49	$\alpha$ -humuleno	2,74 $\pm$ 0,04
<b>13</b>	1459	26,81	Aromadendreno	0,78 $\pm$ 0,01
<b>14</b>	1481	27,68	$\gamma$ -cadineno	23,53 $\pm$ 0,12
<b>15</b>	1491	28,10	Isoledeno	1,91 $\pm$ 0,06
<b>16</b>	1497	28,21	Tridecanona	16,15 $\pm$ 0,06
<b>17</b>	1496	28,32	Biciclogermacreno	4,36 $\pm$ 0,03
<b>18</b>	1505	28,68	$\delta$ -guaieno	3,21 $\pm$ 0,01
<b>19</b>	1523	29,41	$\beta$ -cadineno	3,61 $\pm$ 0,10
<b>20</b>	1557	30,80	Germacreno B	4,13 $\pm$ 0,02
<b>21</b>	1577	31,62	Dehidroaromadendreno	0,49 $\pm$ 0,01
<b>22</b>	1689	36,18	Pentanodec-2-ona	2,52 $\pm$ 0,01

### 5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*

Quanto ao ensaio antibacteriano contra as cepas de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, não se verificou atividade na concentração testada (20 µg/mL), pois as bactérias se mostraram resistentes, com diâmetro do halo menor que 2mm. Acredita-se que esse resultado provavelmente se deva a biosseletividade do óleo. Este resultado também pode estar relacionado à baixa difusão do óleo no meio de cultura por causa da volatilidade que o leva rapidamente para fora do meio de cultura.

### 5.4 ATIVIDADE CITOTOXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*

Os óleos essências de diversos vegetais já se mostraram eficazes quanto ao poder citotóxico (BHALLA et al., 2013).

Os resultados obtidos da análise *in vitro* do potencial citotóxico do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* demonstrou atividade para as quatro linhagens de células tumorais tratadas: SF-295 (glioblastoma), K-562 (leucemia mielóide crônica), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) e HCT-116 (carcinoma colorretal). Os dados de concentração inibitória em µg/mL para 50% das células foram organizados na tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de  $CI_{50}$  (µg/mL) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de três experimentos independentes, feitos em duplicata em 4 linhagens tumorais testadas em comparação com a droga convencional (Doxorrubicina).

<b>Amostra</b>	<b>K-562</b>	<b>HCT-116</b>	<b>SF-295</b>	<b>PC-3</b>
<b>Óleo extraído das folhas frescas.</b>	24,3 (18,1-32,7)	28,4 (26,3-30,8)	24,5 (22,6-26,7)	27,8 (21,6-35,8)
<b>Óleo extraído das folhas secas.</b>	19,1 (14,1-26,0)	29,2 (27,5-31,1)	24,9 (22,4-27,7)	28,7 (18,0-45,7)
<b>Doxorrubicina.</b>	2,92 (2,28- 3,73) (Ferraz, R.P.C, 2013)	0,01 (0,01- 0,02) (SILVA, (E.M.F., 2015)	0,24 (0,17- 0,36) (SILVA, (E.M.F., 2015)	0,0016 (0,0014-0,0018) (SILVA, (E.M.F., 2015)

As concentrações inibitorias (CI<sub>50</sub>) do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* para a linhagem K-562, foram satisfatórias, com CI<sub>50</sub> de 24,3 µg/mL (18,1-32,7) com o óleo obtido das folhas frescas e CI<sub>50</sub> de 19,1 µg/mL (14,1-26,0) com o óleo obtido das folhas secas, enquanto que um estudo feito por Xavier (2011) utilizando óleo essencial de *Lippia microphylla* obteve CI<sub>50</sub> de 60,05 µg/mL (55,28- 65,24) onde foi relatado que a ação dos óleos essenciais de *Lippia microphylla* na apoptose de células da linhagem K-562 está parcialmente associada a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio).

Com relação a atividade citotóxica para a linhagem HCT-116 o valor de CI<sub>50</sub> foi de 28,4 µg/mL (26,3-30,8) para o óleo extraído das folhas frescas e 29, 2 µg/mL (27,5-31,1) para o óleo extraído das folhas secas. Leandro (2015), obteve valores de CI<sub>50</sub> para a linhagem HCT-116 de 48,51 µg/mL (43,42-54,21) e 30,87 µg/mL (26,23-36,34) para o óleo extraído das folhas e talos de *Eperua duckeana* respectivamente. Leandro (2015) também testou a ação citotóxica do óleo de *Eperua duckeana* na linhagem SF-295 obtendo valores de CI<sub>50</sub> de 48,51 µg/mL (43,42-54,21) e 30,87 µg/mL (26,23 – 36,34) para o óleo extraído das folhas e talos respectivamente, enquanto que, os valores de CI<sub>50</sub> encontrados para o óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* foi de 24,5 µg/mL (22,6-26,7) e 24,9 µg/mL (22,4-27,7) para o óleo extraído de folhas frescas e secas respectivamente.

Com relação a linhagem de células PC-3, não foram encontrados dados na literatura sobre óleos essenciais com presença de atividade citotóxica positiva sobre esse tipo celular. Entretanto, o óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* apresentou atividade citotóxica também sobre essa linhagem celular com valores de CI<sub>50</sub> 27,8 µg/mL (21,6-35,8) e 28,7 µg/mL (18,0-45,7) para o óleo extraído de folhas frescas e secas respectivamente.

A presença de alguns compostos no óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* pode ser responsável pelo seu potencial citotóxico, o trans-cariofileno um dos componentes majoritários com percentual de 21,43% já foi descrito na literatura como agente anticarcinogênico por meio de vias apoptóticas e inibição de proliferação de células tumorais (ROSA C.S.et al.,2016).

Estudos com óleos essenciais de *Xylopiya laevigata* mostraram grande concentração do componente  $\gamma$ -cadineno e o no mesmo estudo foi constatado o potencial antitumoral desses óleos. É notório que o componente encontrado em maior concentração (23,53%) no óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* também  $\gamma$ -cadineno. Desta forma há um indicio

de que este componente esteja relacionado aos efeitos citotóxicos de células tumorais (QUINTANS J. S. S. et al., 2012).

Nos resultados obtidos pode-se observar que não houve diferença significativa quanto a utilização das folhas secas ou folhas verdes, os picos cromatográficos apresentaram-se semelhantes para análise dos óleos retirados das folhas secas e verdes, o que indica que essas substâncias apresentam estabilidade ao calor.

### 5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*

Foi determinado por meio da técnica de DPPH. Os óleos essenciais de *Pilocarpus microphyllus* apresentaram satisfatória atividade antioxidante. Os testes mostraram que houve diminuição na concentração do DPPH, o que significa que espécie analisada quanto ao seu potencial antioxidante causou redução DPPH. A absorvância dessa maneira apresentou diminuição, pois os grupos cromóforos do DPPH responsáveis pela absorção tiveram sua concentração diminuída. As médias de inibição percentual são dadas nas tabelas abaixo:

**Tabela 4.** Inibição percentual da absorvância em função da concentração das amostras.

<b>Folhas secas</b>	<b>Abs. amostra 1</b>	<b>Abs. amostra 2</b>	<b>Abs. amostra 3</b>	<b>Média % inib</b>
<b>0,01</b>	1,059	1,058	1,058	13,04%
<b>0,02</b>	0,949	0,949	0,948	22,05%
<b>0,03</b>	0,632	0,632	0,632	48,07%
<b>0,04</b>	0,326	0,326	0,328	73,16%
<b>0,06</b>	0,304	0,304	0,303	75,05%
<b>0,07</b>	0,279	0,279	0,279	77,07%
<b>0,09</b>	0,254	0,243	0,239	79,84%
<b>0,1</b>	0,213	0,213	0,213	82,50%
<b>0,2</b>	0,162	0,161	0,16	86,77%
<b>CN</b>	1,121			

**Tabela 5.** Inibição percentual em função da absorbância das amostras ácido Ascórbico.

Ác. Asc. Concentrações	Abs.Amostra 1	Abs.Amostra 2	Abs.Amostra 3	Média % inib
0,01	0,986	0,986	0,986	12,04%
0,02	0,785	0,785	0,784	30,00%
0,03	0,649	0,649	0,649	42,11%
0,04	0,48	0,479	0,479	57,24%
0,06	0,153	0,151	0,15	86,50%
0,07	0,096	0,096	0,096	91,44%
0,09	0,094	0,094	0,094	91,61%
0,1	0,093	0,093	0,093	91,70%
0,2	0,089	0,089	0,089	92,06%
CN	1,121			

**Tabela 6.**

Inibição percentual em função da absorbância das amostras para folhas frescas.

F F Concentração	Absorção da amostra 1	Absorção da amostra 2	Absorção da amostra 3	Média de Absorção percentual
0,01	1,835	1,835	1,835	4,13%
0,02	1,688	1,751	1,812	8,55%
0,03	1,765	1,763	1,771	7,72%
0,04	1,486	1,487	1,486	22,34%
0,06	1,543	1,547	1,556	19,09%
0,07	0,936	0,936	0,937	51,08%
0,09	1,037	1,044	1,067	45,18%
0,1	1,272	1,277	1,295	33,05%
0,2	0,609	0,608	0,608	68,22%
CN	1,914			

A partir dos gráficos de regressão foram calculados os valores de  $CI_{50}$  mostrados na tabela 7 abaixo.

**Tabela 7.** Valores de concentração inibitória percentual ( $CI_{50\%}$ ) em  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para atividade antioxidante dos extratos das folhas secas, frescas e ácido ascórbico (controle positivo).

	Valor médio de $CI_{50}$	Desvio Padrão
Folhas secas	4,7	$\pm 0,0000044$
Folhas frescas	15, 3	$\pm 0,0034$
Ácido Ascórbico	4,1	$\pm 0,0035$

De acordo com os dados da tabela a concentração inibitória das folhas secas é semelhante aos valores de concentração inibitória do antioxidante comercial o ácido Ascórbico, nota-se também que as folhas secas apresentaram-se aproximadamente três vezes mais eficientes se quando comparadas as folhas frescas. Outros trabalhos testaram

óleos essenciais quanto a sua atividade antioxidante. Andrade M. A et al., (2012) testam o óleo essencial pelo método do DPPH de *C. nardus* obtendo  $CI_{50\%}$  de  $517,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . *Camelia sinensis*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia aromática*, *Camelia sinensis*, apresentaram valores de  $CI_{50}$  de  $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $370 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $460 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $760 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $960 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente (MORAIS S. M, 2009).

#### 5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pilocarpus microphyllus*.

O óleo essencial das folhas frescas do *Pilocarpus microphyllus* apresentou atividade antifúngica para as cepas: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32269, *Cryptococcus neoformans* ATCC 24066, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, mas não inibiu *Candida albicans* ATCC 10231. A tabela 8 mostra os valores de concentração mínima inibitória.

**Tabela 8.** Valores de concentração mínima inibitória (CIM) para folhas frescas.

<b>Cepas</b>	<b>CIM</b>
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32269	0,156 $\mu\text{L/mL}$
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 24066	2,5 $\mu\text{L/mL}$
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	5 $\mu\text{L/mL}$
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	$CIM_{50}$ : 2,5 $\mu\text{L/mL}$ / $CIM_{90}$ : 5 $\mu\text{L/mL}$
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	> 5 $\mu\text{L/mL}$ (Não inibiu)

O óleo essencial das folhas secas do *Pilocarpus microphyllus* apresentou atividade antifúngica apenas para as cepas: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32269 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 24066, mas não inibiu *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231. A tabela 9 mostra os valores de concentração mínima inibitória.



**Tabela 9.** Valores de concentração mínima inibitória (CIM) para folhas secas.

<b>Cepas</b>	<b>CIM</b>
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32269	0,625 µL/mL
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 24066	MIC 50: 2,5 µL/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	> 5µL/mL (Não inibiu)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	MIC > 5µL/mL (Não inibiu)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	MIC > 5µL/mL (Não inibiu)

Na tabela 10 aparecem os valores de concentração mínima inibitória para droga padrão Anfotericina B. Nesta pode-se notar que os valores de CIM foram aproximadamente 10 vezes maiores de comparados as valores encontrado para o óleo das folhas frescas e aproximadamente 25 vezes maior se comparado as folhas secas para a inibição de *Cryptococcus neoformans* ATCC 32269.

**Tabela 10.** Valores de concentração mínima inibitória (CIM) para Anfotericina B.

<b>Cepas</b>	<b>CIM</b>
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 32269	16 µg/mL
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 24066	4 µg/mL
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1 µg/mL
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2 µg/mL
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1µg/mL

Estes resultados podem ser entendidos pelo fato de os compostos do óleo terem maior atividade por fungos leveduriformes, como é o caso do antifúngico fluconazol. Outra explicação para os fungos filamentosos terem sido resistentes apesar da concentração utilizada ser maior é a questão do tempo de incubação, que é bem superior ao das leveduras, e por isso o óleo pode volatilizar, não exercendo sua atividade.

Alguns estudos já mostraram que 60% dos óleos essenciais apresentam atividade antibacteriana (OLIVEIRA R. A. G., 2006).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, os resultados obtidos mostraram que o óleo essencial extraído a partir das folhas de *Pilocarpus microphyllus* não demonstrou atividade antibacteriana contra as cepas de bactérias testadas na concentração utilizada, provavelmente devido à baixa atividade desse extrato.

Por outro lado, o óleo demonstrou atividade antitumoral em ensaios *in vitro*, visto que, apresentou potencial citotóxico diante das quatro linhagens de células tumorais humanas que foram testadas, com resultados satisfatórios em comparação a outros óleos relatados na literatura com a mesma atividade. Apresentou atividade contra cepas de fungos *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, além de ser eficaz contra radicais livres quando testado pelo método DPPH, portanto pode representar uma nova abordagem contra esses agentes causadores diversas patologias.

Os testes cromatográficos mostraram cromatogramas semelhantes para folhas secas e frescas o que tornou evidente que estas substâncias apresentam estabilidade ao calor, no entanto, os ensaios biológicos mostraram que estes compostos reagiram de forma diferente nas situações estudadas.

Diante disso pode-se afirmar que este estudo contribui para o desenvolvimento de novas pesquisas na área com o intuito de conhecer melhor as propriedades farmacológicas e mecanismos de ação do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* e seus componentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.A.S. et al. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. *Revista Uningá Review*. Vol.21, n.1,p.55-59. 2015
- ANDRADE M. A. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun, 2012.
- AFOULOUS, S.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E. G.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; COUDERC, F.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticâncer, antiinflammatory, antioxidante and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. *Food and chemical toxicology*, v. 56, p. 352-362, 2012.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, n.1, p.118-129, 2005.
- AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in câncer treatment. *Clinical cancer research*, v.13, p.7271-7279, 2007.
- AURELI, P., COSTANTINI, A., ZOLEA, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55:344–348, 1992.
- BARBOSA ,K. B. F. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n.2, p. 446-75, 2008.
- BATISTA, O., A. DUARTE, J. NASCIMENTO, AND M. F. SIMONES. Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *J. Nat. Prod.* 57:858–861, 1994.
- BERNARDO-GIL, M.G.; RIBEIRO, M.A.; ESQUÍVEL, M.M. Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Indústria Alimentar, Boletim de Biotecnologia*, p. 14-21, 2003.
- BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.
- BHALLA, Y.; GUPTA, V.K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of food and agriculture*, p.1-11, 2013.
- BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

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

BRITTO, A. C. S.; OLIVEIRA, A. C.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. *Planta medica*, v. 78, p. 409-414, 2012.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods— a review. *International journal of food microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALCAGNO, M.P.; COLL, J.; LLORIA, J.; FAINI, F.; ALONSO-AMELOT, M.E. Evaluation of synergism in feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. *J. Chem. Ecol.*, v. 28, n. 1, 175-191, 2002.

CASTRO, C.; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A. L.; JACOVINE, L. A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* Cheel. *Revista Árvore*, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.

CATANI, P. Terapia genica do câncer associando reparo da via p53 à imunoestimulação por IFN  $\beta$ . Tese apresentada a faculdade de medicina de São Paulo para obtenção do título de doutor em ciências, 2014.

CHAUDOT, X.; TAMBUTÉ, A.; CAUDE, M. L'Extraction en Phase Supercritique: Un Nouvel Outil Analytique Performant Pour le Traitement de L'échantillon, *Analisis*, v. 25, n. 81, 1996.

CHESTER, T. L.; PINKSTON, J. D.; RAYNIE, D. E. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 12, p. 106-130, 1994.

CORRÊA, M.P. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1969. v. 4. 374 p.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v.1, p.241-256, 2009.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Essential Oils From Brazilian Rutaceae. I. Genus *Pilocarpus*. *Journal of Natural Products*, v. 42, n. 6, p. 669-671, 1979.

DE BONA, E. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

DEGÁSPARI, C. H. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun./2004.

DE SOUZA, R.C. et al. Constituintes químicos de *Pilocarpus grandiflorus* (Rutaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26., Poços de Caldas, 2003. Livro de Resumos. São Paulo: SBQ, 2003, PN-203.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOUGLAS HANAHAN., ROBERT A. WEINBERG. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Elsevier Inc . Cell 144, March 4, 2011.

FALCÃO, M. A. Estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim limão e suas frações para produtos de higiene corporal. Porto Alegre, 2012.

FERRAZ, R.P.C. Potencial anticâncer do óleo essencial das folhas de *Lippia Gracilis* Schauer (verbenaceae) – Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Sergipe, 2013.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu, 469 p. 2004.

FERREIRA A.L.A., et al. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* vol.43 n.1 São Paulo Jan./Mar. 1997

FIGUEIREDO, A.C.S. *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*: produção de metabólitos secundários in vivo e in vitro. 1992. 208 p. [Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa].

FILIPPIS, F. de M. Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essencial de Hon-sho e Ho-sho-experimentos e modelagem. 2001. 114p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

FONTES, J. E. N.; FERRAZ, R. P.; BRITTO, A. C.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Gutteria pogonopus* (Annonaceae). *Chemistry & Biodiversity*, v. 10, p. 722-729, 2013.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragrance Journal*, v. 25, p. 112-113, 2010.

GALVÃO, E. L. et., Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(3): 551-557, jul.-set. 2008

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L.J.D.; SINGLA, A.K. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid Hesperidin. *Phytother. Res.*, v. 15, p. 655-669, 2001.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*, abr. 2011.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUENTHER, E. Individual Essential Oils of the plant Family Myrtaceae. In: *The Essential Oils*, 4.ed.V.4. New York: Van Nostrand, 1977.

GUIMARÃES. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*. vol.33 no.3 São Paulo 2010.

HINOUE, J. B. et al. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Die Pharmazie*, v. 44, n. 4, p. 302-303, 1989.

HOLMSTEDT, B., WASSÉN, S. H. & SCHULTES, R. E.. 1979. Jaborandi: an interdisciplinary appraisal. *Journal of Ethnopharmacology* 1 (1) : 3-21. HUANG, L. et al. Anti-Aids agents 15. Synthesis and anti-HIV activity of dihydroselelins and related analogs. *J. Med. Chem.*, v. 37, n. 23, p. 3947- 3955, 1994.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; GYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, v. 42, n.4, p.377-387, 2007.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura*, v. 28, 2013.

IKAN, R. *Natural Products*. 2. ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1991. 360 p.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *ESTIMATIVAS PARA 2016: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2015.

IVETE C. C. et al. Immune response to *Candida albicans*. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 27-40, jan./jun. 2008

JEDLICKOVA, Z. et al. Antibacterial properties of the Vietnamese Cajeput oil and Ocimum oil in combination with antibacterial agents. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology & Immunology*, v. 36, n. 3, p. 303–309, 1992.

JOSEPH, C. J. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras). *Mecânica Popular*, Rio de Janeiro, Outubro, 1-9, 1967.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KAMDEM, J. P. Antioxidant and Neuroprotective properties of *Trichilia catigua* (catuaba) against ischemia- reperfusion and pro-oxidants agents in rat Hippocampal slices. 117 f. Posgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry. Porto Alegre, RS, Brasil. 2013.

KIM, S.R.; PARK, M.J.; LEE, M.K.; SUNG, S.H.; PARK, E.J.; KIM, J.; KIM, S.Y.; OH, T.H.; MARKELONIS, G.J.; KIM, Y.C. Flavonoids of *Inula britannica* protect cultured cortical cells from necrotic cell death induced by glutamate. *Free Radical Biol. Med.*, v. 32, n. 7, p. 596-604, 2002.

KNEZEVIC, P. et al. Antimicrobial activity of eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *acinetobacter baumannii*. *Journal of ethnopharmacology*, v. 178, p. 125-136, 2016.

LANGE, B. M., RUJAN, T., MARTIN, W., CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *PNAS*, v. 97, n. 24, p. 13172–13177, 2000.

LEANDRO, L. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; SALES, A. P. B.; PESSOA, C. O. Composição química e atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* Cowan. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, v. 14, n. 1, p. 42 – 47, 2015.

LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LESJAK, M. et al. Binary and tertiary mixtures of *satureja hortensis* and *origanum vulgare* essential oils as potent antimicrobial agents against *helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*, 2015.

LEVIN, Donald A. The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology*, p. 3-15, 1973.

LIMA., D.F. Prospecção Tecnológica, perfil químico sazonal de alcaloides imidazólicos, aspectos polimórficos moleculares e morfológicos de *Pilocarpus microphyllus* Stapt ex Wardleworth (Jaborandi). Tese de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí – UFPI, 2016.

LIMA I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* . 16(2): p. 197-201, Abr./Jun. 2006. ISSN 0102-695X

LIU, F.; LIU, D.; YANG, Y.; ZHAO, S. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncology letters*, v.5, p.1261-1265, 2013.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Cytotoxic Activity of Essential Oils from Labiatae and Lauraceae Families Against In Vitro Human Tumor Models. *Anticancer Research*, v. 27, p. 3293-3300, 2007.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: na evolutionary perspective. *Drug Discov Today*, v. 14, p. 1136-1142, 2009.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Caderno acadêmico*, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACÍAS, F.A. et al. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *J. Chem. Ecol.*, v. 19, n. 7, p. 1371-1379, 1993.

MAEDA, H.; YAMAZAKI, M.; KATAGATA, Y. Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil-induced apoptosis and differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 3, p. 49-52, 2012.

MAFEZOLI, J. et al. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 73, p. 335- 340, 2000.

MANDERFELD, M.M.; SCHAFER, H.W.; DAVIDSON, P.M.; ZOLLOTA, E.A. Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley. *J. Food Prot.*, v. 60, n. 2, p. 72-77, 1997.

MARDER, M.; PALADINI, A.C. GABAA-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 2, p. 853-863, 2002.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International journal of food microbiology*, v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.673-751, 2000.

MIRANDA, C.A.S.F., et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan-mar, 2016).

MOMESSO L. S. et al., Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(3), ISSN 0102-695X, 660-663, Jul./Set., 2009.

MORAES M. F et al. Meningite por *Cryptococcus neoformans* – diagnóstico e tratamento *Cryptococcus neoformans meningitis*. Núcleo de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário Faculdades Metropolitanas Unidas. São Paulo-SP, 2013



MORAIS S. M. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(1B): 315-320, Jan./Mar. 2009

MUNTOREANU, T. G, Descrição e mapeamento de caracteres morfo-anatômicos Foliares em *Pilocarpus Vahl* (Rutaceae) e gêneros relacionados. 98p. Dissertação de mestrado- Instituto de Biocências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

NASCIMENTO, J. C., et al, Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. *Revista brasileira de farmácia*. Belo Horizonte, MG, Brasil 2011.

NEGRI, G.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A.; SKORUPA, L.A. An aromatic hydrocarbon from the foliar epicuticular wax of *Pilocarpus jaborandi*. *Phytochemistry*, v. 49, n. 1, p. 127-129, 1998.

OHNO, T. et al. Antimicrobial activity of essential oils against helicobacter pylori. *Helicobacter*, v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.

OLIVEIRA, A. R. M. F.; JEZLER, C. N.; OLIVEIRA, R. A.; MIELKE, M. S.; COSTA, L. C. B. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. *Horticultura Brasileira*, v.30, p. 155-159, 2012.

OLIVEIRA, M. A. et al. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: Uma prospecção tecnológica. *Revista GEINTEC*, v. 4, n. 4, p.1292-1298, 2014.

OLIVEIRA R. A. G., Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(1): p. 77-82, Jan./Mar. 2006

PADUCH, R.; SZERSZEŃ, M. K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 55, n. 5, 2007.

PARDHASARADHI, B. V. V.; REDDY, M.; ALI, A. M.; KUMARI, A. L. KHAR, A. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts o humaan tumor cell lines: Role of reactive oxygen species and glutathione. *J. Biosci*, v. 30, p. 237-244, 2005.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. Flavonoids as medical agents - recent advances. *Fitoterapia*, v. LXII,p. 317-389, 1991.

PAVÃO F. et al. Structure of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. *FEBS Lett.*, v. 520, p. 13-17, 2002.

PERES, L. E. P. *Metabolismo Secundário*. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p. 1-10.

PINHEIRO, A. L. Produção de óleos Essenciais, Viçosa: CPT, 2003.

POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELLES, M. A. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Journal of Supercritical Fluids*, v. 21, p. 245–256, 2001.

PRABUSEENIVASAN, S. et al. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 6, n. 1, p. 1, 2006.

PROBST, Isabella da Silva. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. 2012. 102 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

QUEIROGA, G.M.T, Plantas medicinais e fitoterápicos como alternativa terapêuticas as infecções urinárias: Um diagnóstico dessa realidade na saúde pública de Mossoró. 2015. 121f. Dissertação de mestrado em ambiente, tecnologia e sociedade – Biblioteca central Orlando Teixeira- campus Mossoró. Rio Grande do Norte.

QIU, J. et al. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, v.6, n.1, jan. 2011.

QUINTANS, J.S.S. et al. Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata*. *Planta medica*, v. 79, p. 123-130, 2013.

RACHEL B. C. et al. Fungos Dematiáceos Fungos negros que afetam animais, plantas e o homem. *Biociência Ciência & Desenvolvimento*. V.11,n.1,p. 22-25. 2011

RAMAKRISHNAN, R.; GABRILOVICH, D. I. Novel mechanism of synergistic effects of conventional chemotherapy and immune therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother*, v.62, p.405-410, 2013

RATLEDGE, C.; WILKINSON, S. G. An overview of microbial lipids. *Microbial lipids*, v. 1, p. 3-22, 1988.

RIBEIRO, J.N., et al. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. Instituto de Química- Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2005.

RIBEIRO, S. M. R., et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 21, n. 3, p.133-149, setembro/ dezembro. 2005.

RIBEIRO, S. S. et al. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. *Plant med*, v. 78, p.1601-1606, 2012

ROSA, C.S. 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.*, Campinas, v.18, n.1, p.19-26, 2016.

ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. *Saúde & Ambiente em Revista*, v.1, n.2, p.76-85, 2006.

SABÁ, R.T., LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. Q.; GOMES, A. P. R.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. *Horticultura Brasileira*, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.

SADEGHI, I.; YOSEFZADI, M.; BEHMANESH, M.; SHARIFI, M.; MORADI, A. In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja intermedia*. *Irian red crescent medical journal*, v. 15, p. 70-74, 2013.

SANGWAN N.S., FAROOQI A.H.A., SHABIH F. SANGWAN R.S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. V. 34, p. 3–21, 2001.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, v. 40, n. 2, p. 116-137, 2004.

SANTOS F. E. M. et al. Detecção de fungos patogênicos em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). *Ciência Florestal*, v.11, n.1, p.13-20

SARTOR, R. B. Modelagem, Simulação e Otimização de uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais por Arraste a Vapor. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos) 99p. Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SERRACARBASSA P. D. Endoftalmite por *Candida albicans*. *Arq. Bras. Oftalmol.* vol.66 n.5 p.701-707 São Paulo . 2003

SHAW, C.Y.; CHEN, C.H.; HSU, C.C.; CHEN, C.C.; TSAI, Y.C. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytother. Res.*, v. 17, n. 7, p. 823- 825, 2003.

SILVA, A. R. Tudo sobre aromaterapia. Sao Paulo: Roca, 1998. 624 p.

SILVA, E. C. B., et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. *Ciênc. vet. tróp.*, Recife-PE, v. 13, no 1/2/3, p. 9 - 16 - janeiro/dezembro, 2010.

SILVA, E.M.F., et al. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.*, 36(2): 277-283; ISSN 1808-4532, 2015.

SILVA, M. G. F. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana L.*) e manjeriço (*Ocimum basilicum L.*). 70p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPTIZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora UFSC, p. 467-495, 2003.

SOLÓRZANO-SANTOS, F; MIRANDA-NAVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 1-6, 2011.

SCHERER, R., Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v.11, n.4, p.442-449, 2009.

STEFFENS, A. H. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. Porto Alegre, 2010.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in câncer. *Journal of oncology*, v. 2013, p.1-14, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; trad. SANTAREM et al. *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. TAVEIRA, Francisca SN et al. Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 1, p. 27-31, 2003.

TAFURT-GARCÍA, G.; MUÑOZ-ACEVEDO, A. Metabolitos volátiles presentes en *Protium heptaphyllum* (Aubl.). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 11, n. 3, p. 223-232, 2012.

THIRUGNANASAMBANTHAN, P. et al. Analgesic activity of certain flavone derivatives: a structure-activity study. *J. Ethnopharmacol.*, v. 28, p. 207-214, 1990.

VALTER, J.E., et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Campo Grande – MS 2008.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

XAVIER, A. L. Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *lippia microphylla* cham (verbenaceae) e sua toxicidade. (Dissertação de mestrado), 2011.

WILKINSON, J. M. et al. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 1, p. 76-81, 2003.

WIRTZ, D.; KONSTANTOPOULOS, K.; SEARSON, P. C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews | Cancer*, v. 11, p. 512-522, 2011.

XAVIER, A. L. ; Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia Microphylla* cham. (verbenaceae) e sua toxicidade. 2011. 95f. Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Dissertação de mestrado – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa PB.

YOUSEF, R. T.; TAWIL, G. G. Antimicrobial activity of volatile oils. *Die Pharmazie*, v. 35, n. 11, p. 698-701, 1979.

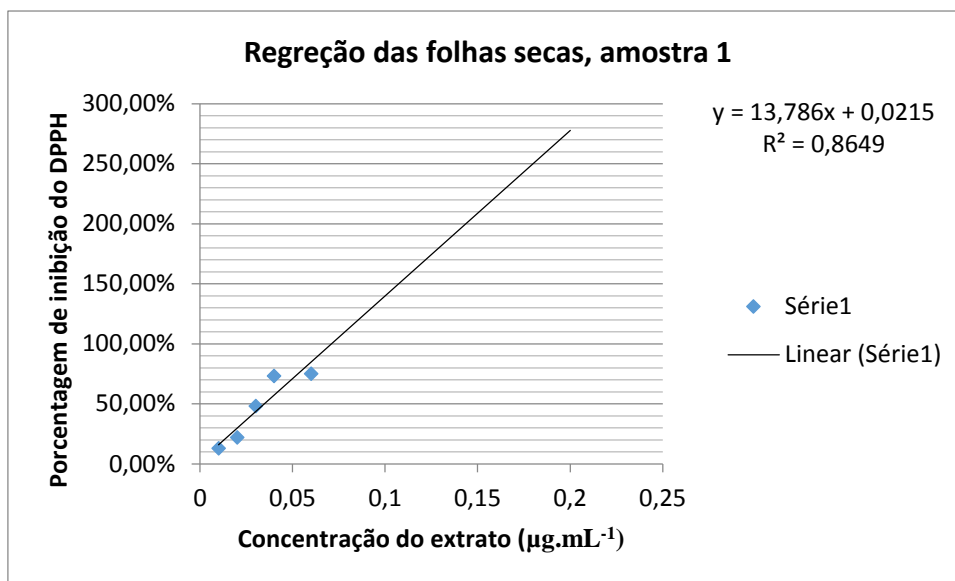
ZANANDREA, I. et al., Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 14, supl. 01, p. 14-16, 2004. ISSN: 0102-695X

ZIMMERMANN, A. M. et al. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. *Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2008.

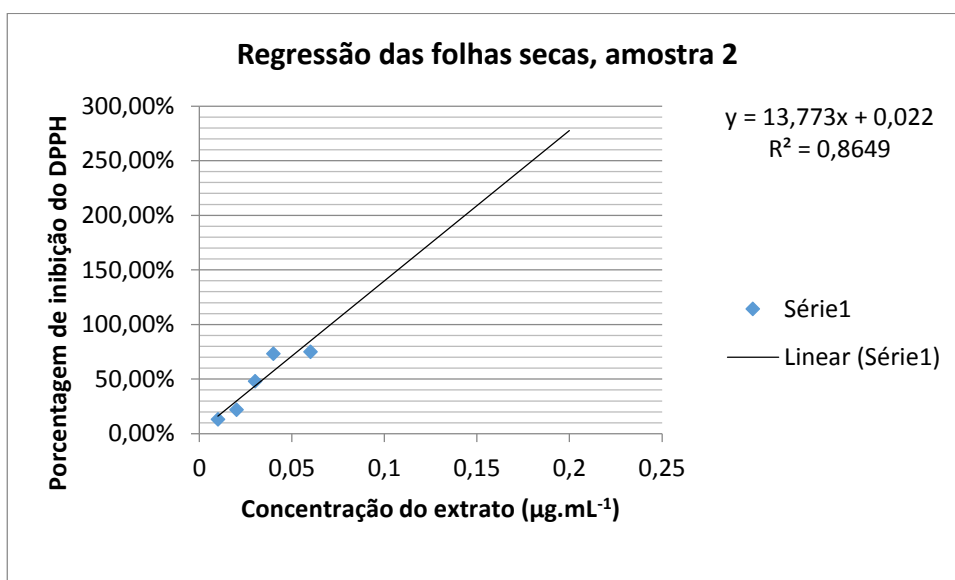
## Apêndice

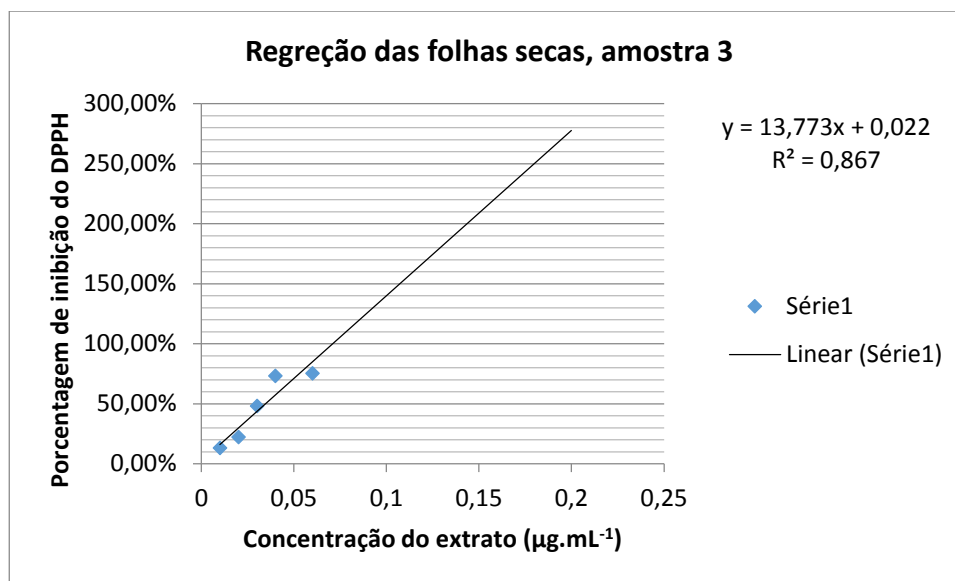
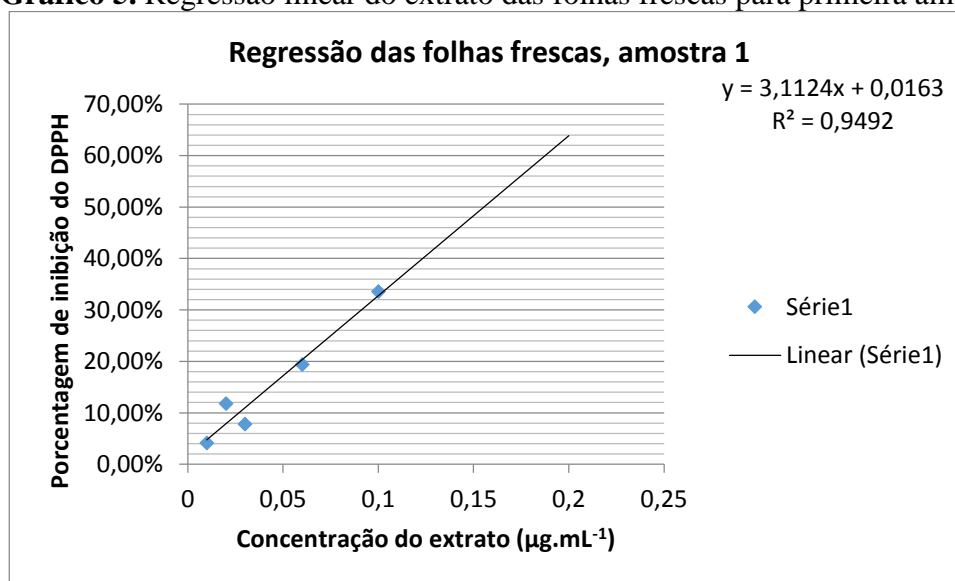
Abaixo são apresentados gráficos de regressão linear para o extrato das folhas secas, frescas e Ácido Ascórbico, todos em triplicata, em que o percentual de inibição do DPPH (eixo Y) estar em função da concentração dos extratos (eixo X).

**Gráfico 2.** Regressão linear do extrato das folhas secas para primeira amostra.

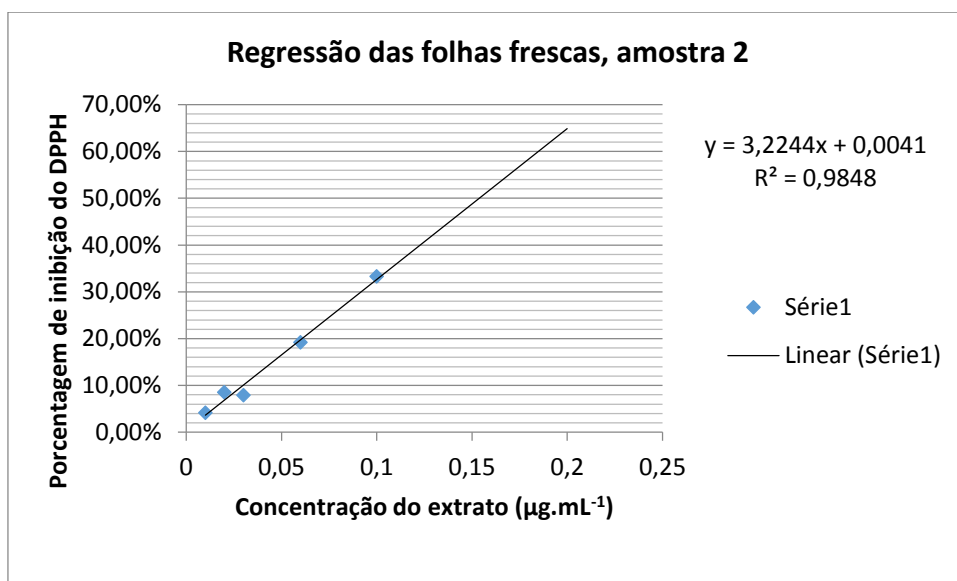


**Gráfico 3.** Regressão linear do extrato das folhas secas para segunda amostra.

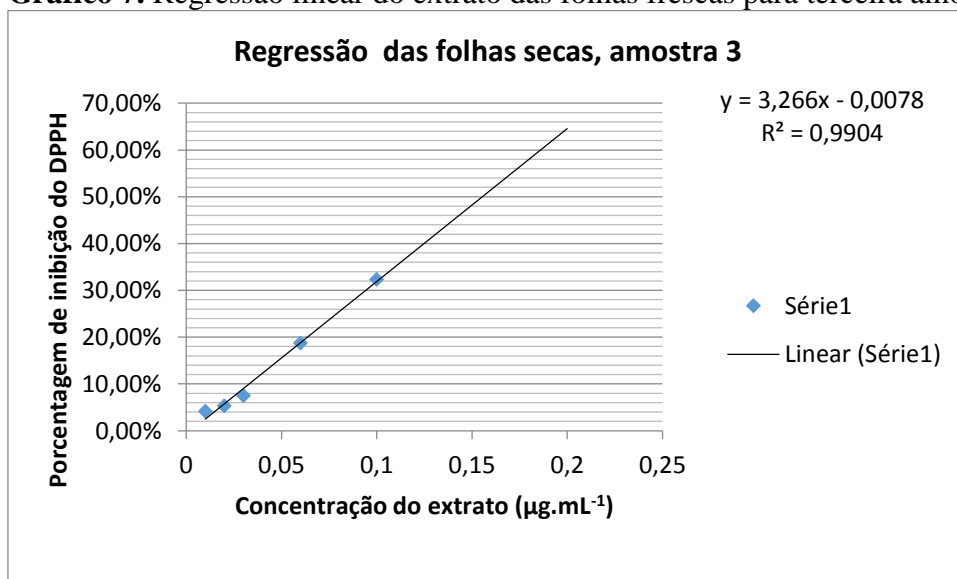


**Gráfico 4.** Regressão linear do extrato das folhas secas para terceira amostra.**Gráfico 5.** Regressão linear do extrato das folhas frescas para primeira amostra.

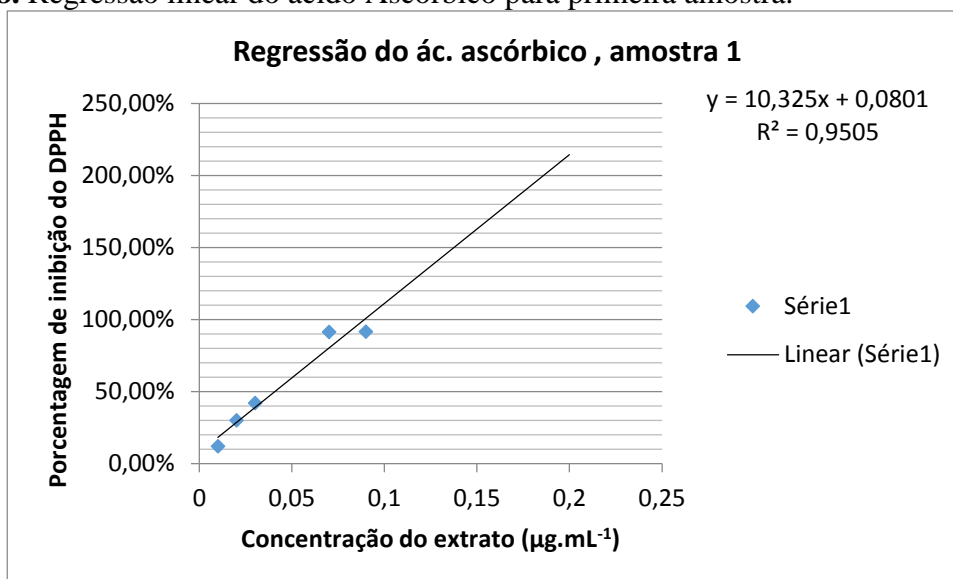
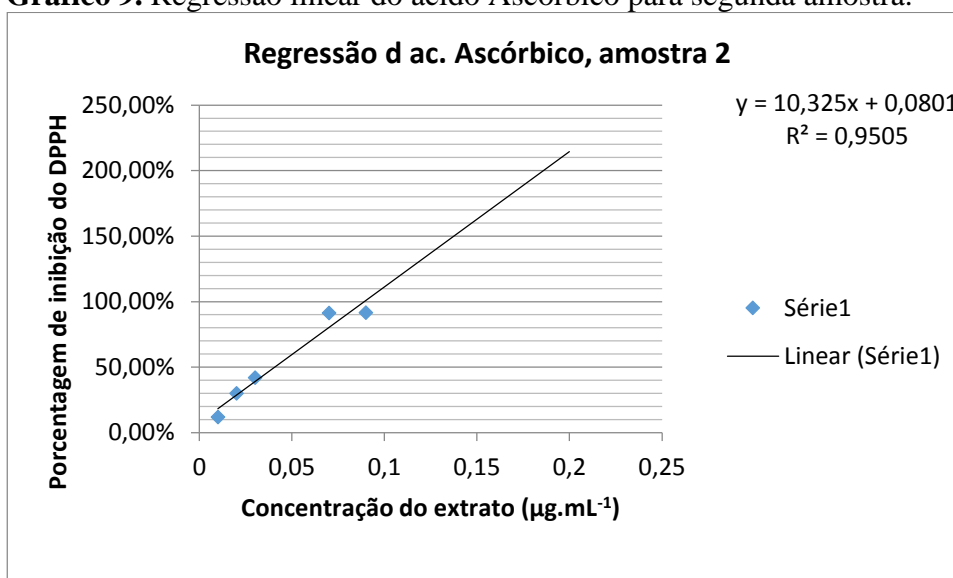
**Gráfico 6.** Regressão linear do extrato das folhas frescas para segunda amostra.



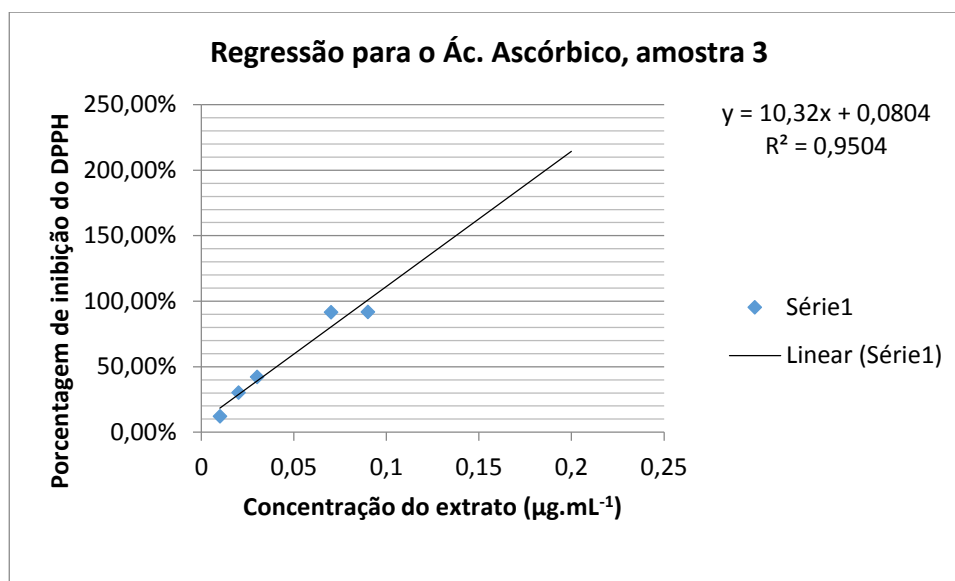
**Gráfico 7.** Regressão linear do extrato das folhas frescas para terceira amostra.





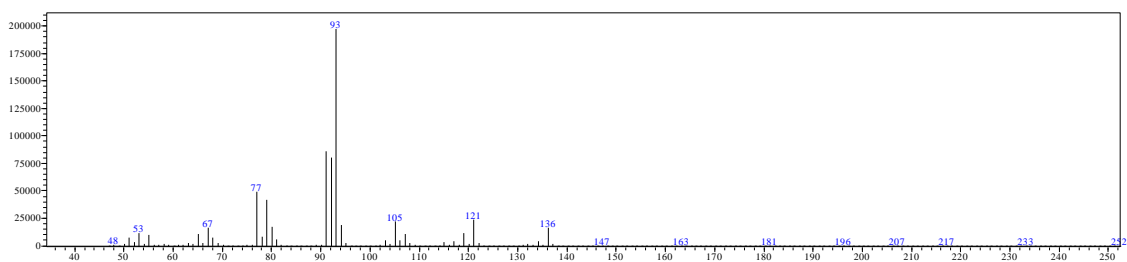
**Gráfico 8.** Regressão linear do ácido Ascórbico para primeira amostra.**Gráfico 9.** Regressão linear do ácido Ascórbico para segunda amostra.

**Gráfico 10.** Regressão linear do ácido Ascórbico para terceira amostra.

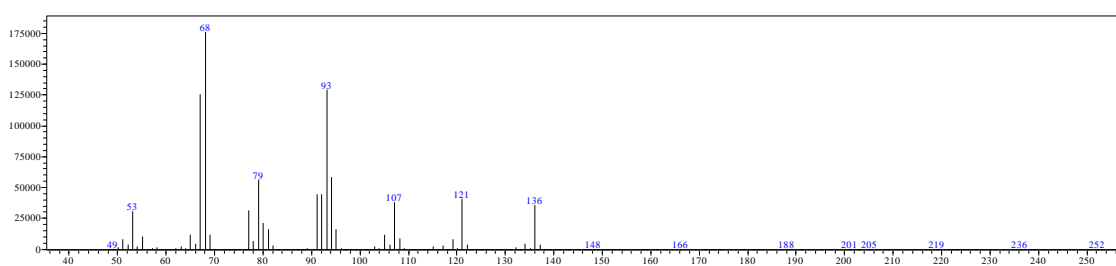


## Espectros de massas

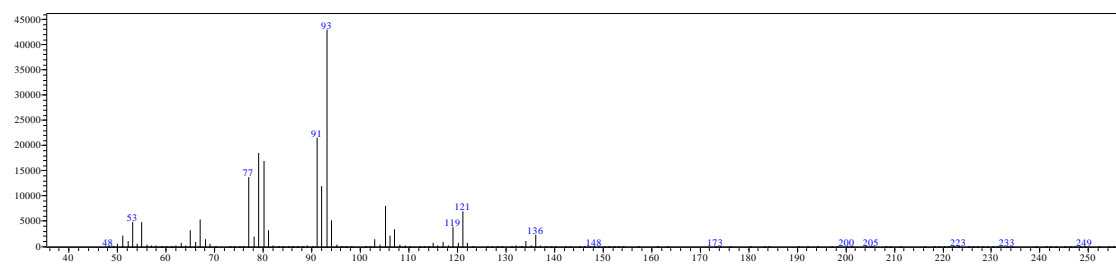
### Substância 1



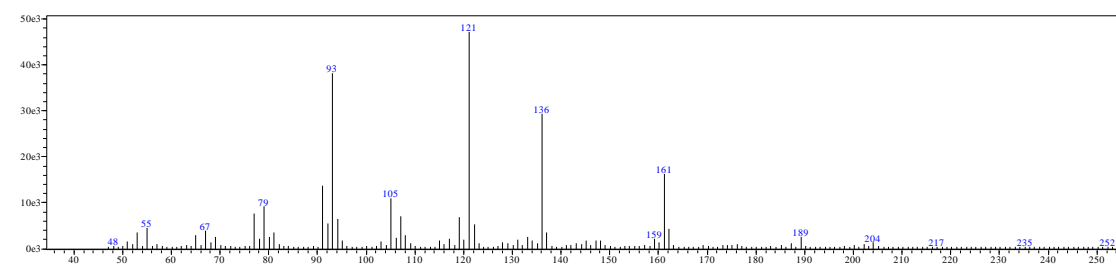
### Substância 2



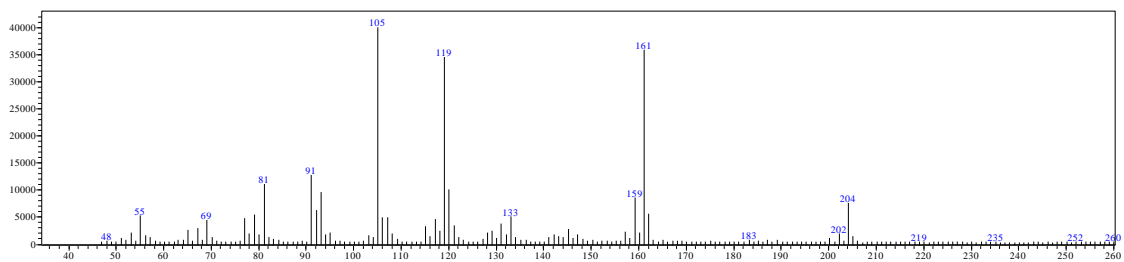
### Substância 3



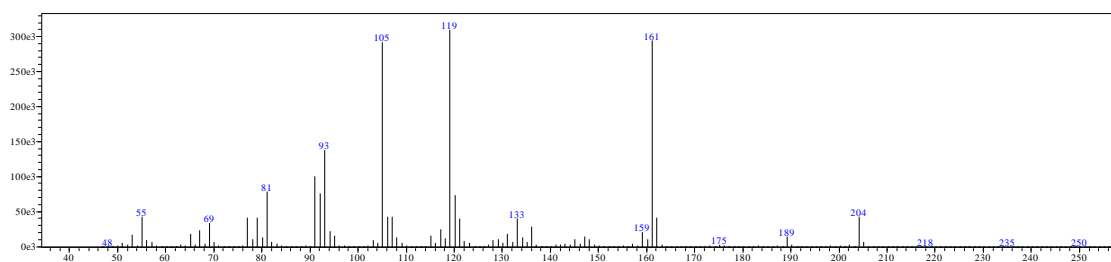
### Substância 4



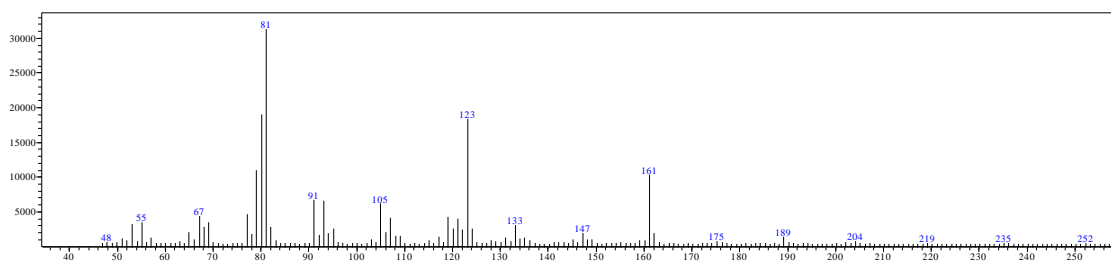
## Substância 5



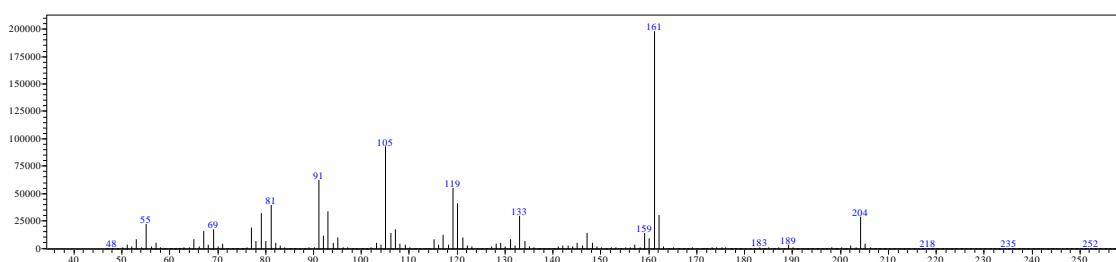
## Substância 6



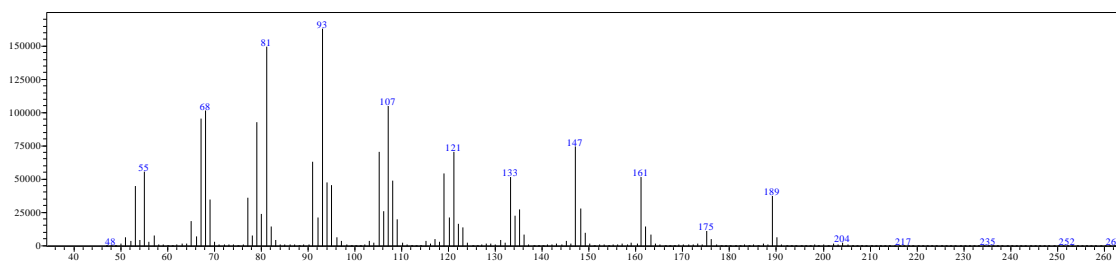
## Substância 7



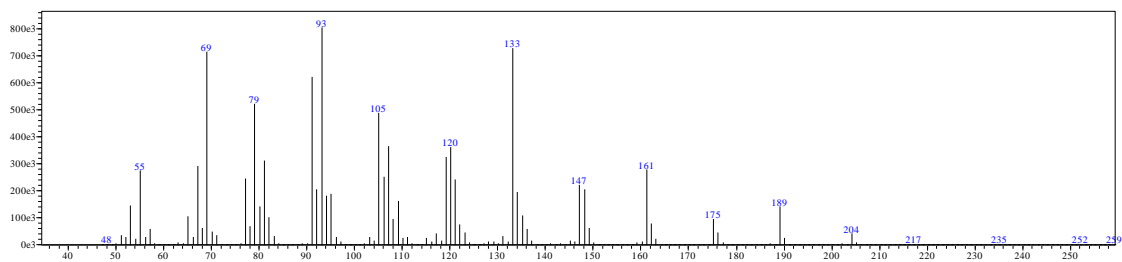
## Substância 8



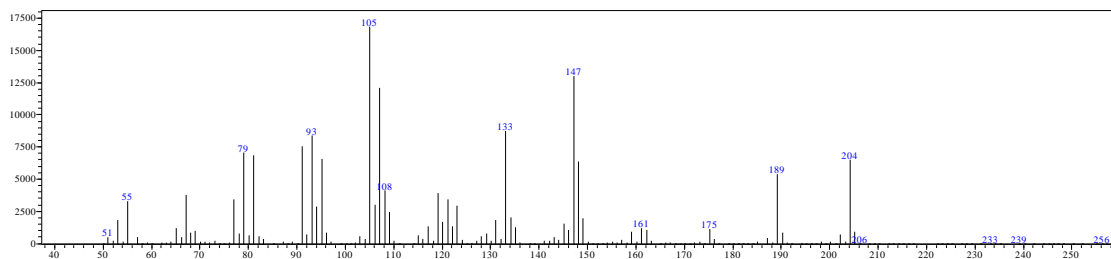
## Substância 9



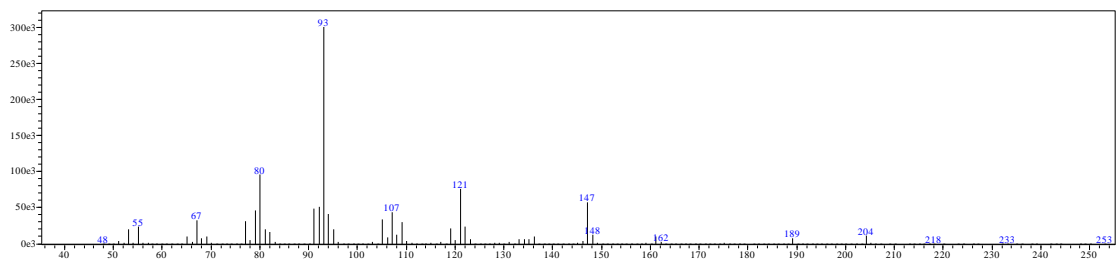
## Substância 10



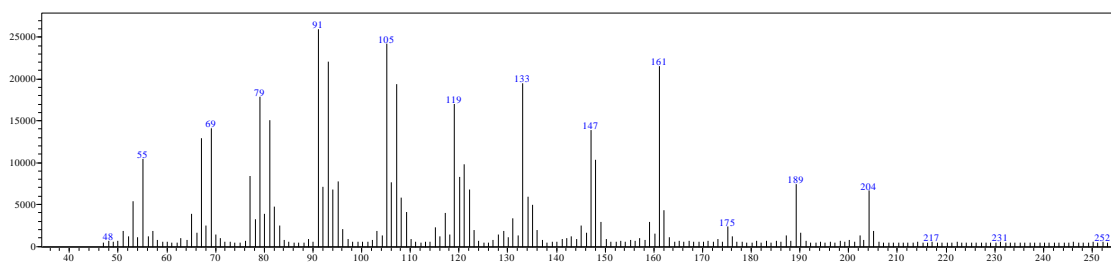
## Substância 11



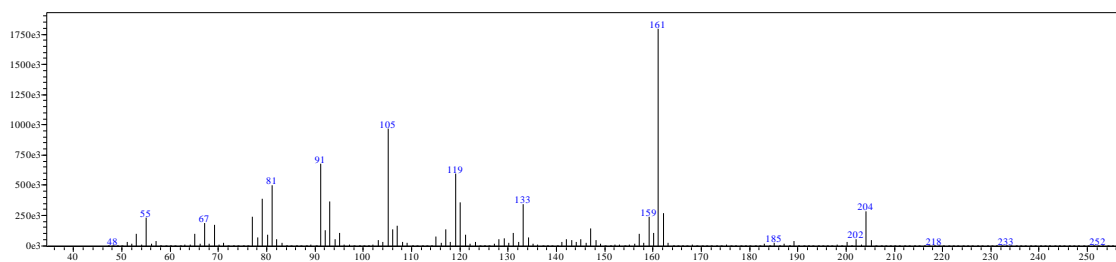
## Substância 12



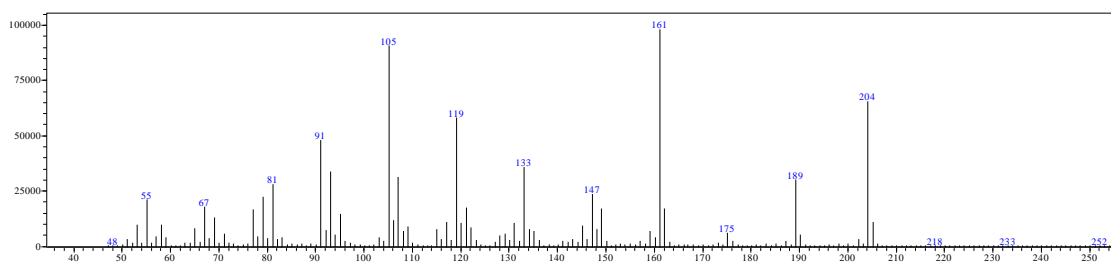
## Substância 13



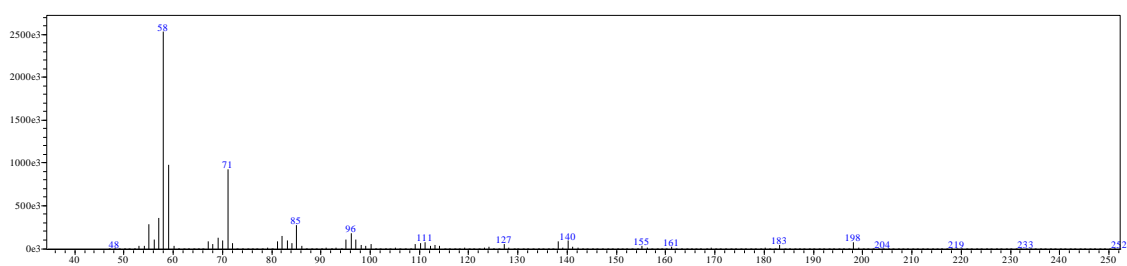
## Substância 14



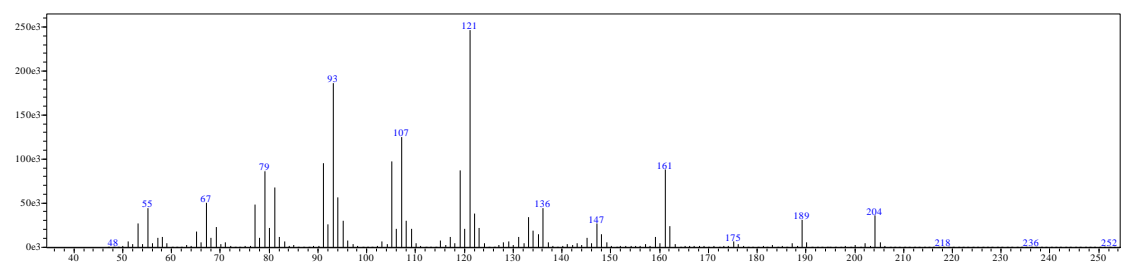
## Substância 15



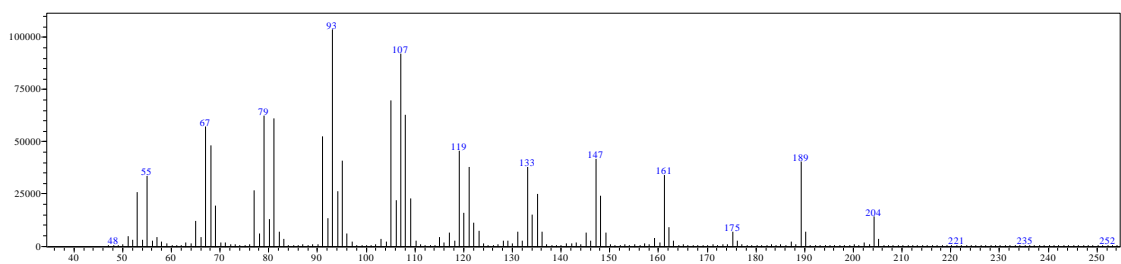
## Substância 16



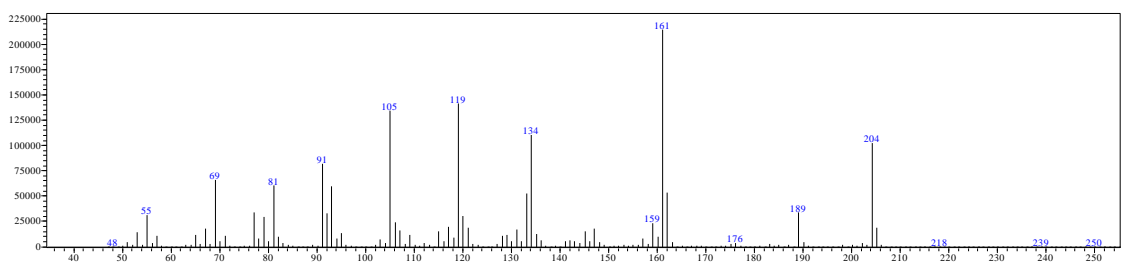
## Substância 17



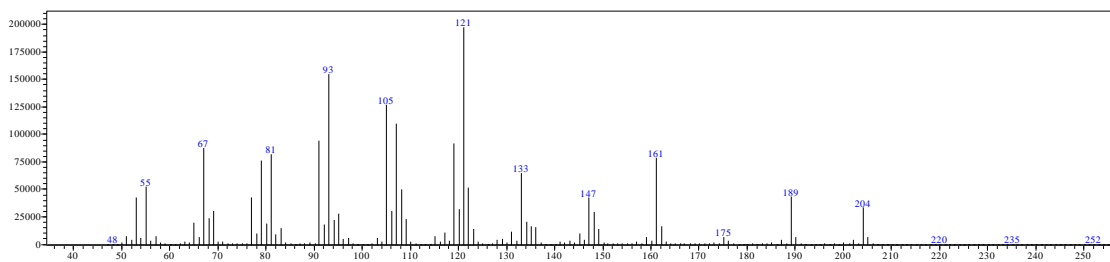
## Substância 18



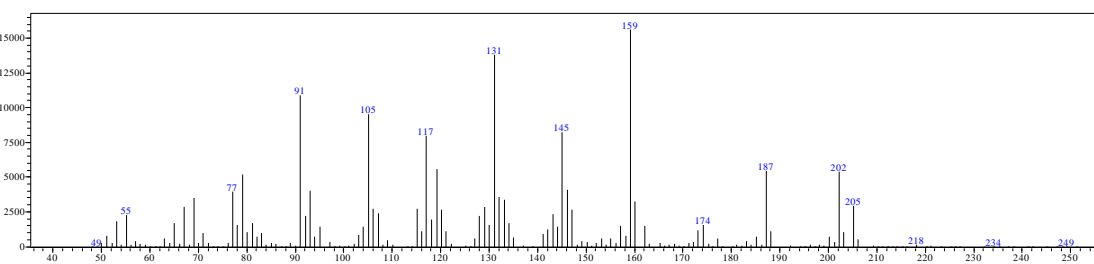
## Substância 19



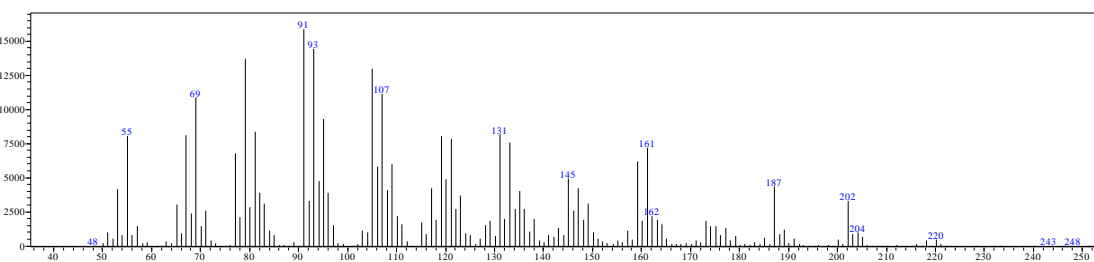
## Substância 20



## Substância 21



## Substância 22 e 23



## Substância 24

