UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCELO BATISTA DOS SANTOS

VOLÁTEIS DE ESPÉCIES COLETADAS NA FLORESTA DO NACIONAL DO IBURA EM SERGIPE E ATIVIDADES CITOTÓXICA E LARVICIDA SOBRE O MOSQUITO *Aedes aegypti*

VOLATILES COLLECTED IN THE IBURA FLOREST IN SERGIPE AND ACTIVITY AGAINST THE MOSQUITO LARVA Aedes aegypti

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCELO BATISTA DOS SANTOS

VOLÁTEIS DE ESPÉCIES COLETADAS NA FLORESTA DO NACIONAL DO IBURA EM SERGIPE E ATIVIDADES CITOTÓXICA E LARVICIDA SOBRE O MOSQUITO *Aedes aegypti*

Exame de qualificação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: **Prof. Dr. Péricles Barreto Alves**

VOLATILES COLLECTED IN THE IBURA FLOREST IN SERGIPE AND ACTIVITY AGAINST THE MOSQUITO LARVA Aedes aegypti

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Master Qualification exam presented to the Graduate Programm in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.

FICHA CATALOGRÁFICA

COMISSÃO EXAMINADORA:

ORIENTADOR: Prof. Dr. Nome do orientador

1º MEMBRO TIT.: Prof. Dr. Nome do membro titular

2º MEMBRO TIT.: Prof. Dr. Nome do membro titular

SÃO CRISTÓVÃO - SE

Novembro, 2018

RESUMO

As plantas medicinais e aromáticas são largamente utilizadas desde o surgimento das civilizações por vários povos e de diversas maneiras. Diante do conhecimento de suas propriedades medicinas faz-se necessário o estudo minucioso visando a busca de novas fontes para obtenção de princípios ativos, responsáveis por ações farmacológicas e terapêuticas. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo analisar a composição química e os efeitos citotóxicos e larvicidas dos óleos essenciais das folhas das espécies conhecida popularmente como “Graviola da montanha” (*Annona montana*-Annonaceae), Breu branco (*Protium heptaphyllum*-Burseraceae) e Pindaíba (*Xylopia frutescens*-Annonaceae) coletadas na floresta nacional do Ibura, que está situada no município de Nossa Senhora do Socorro, em Sergipe. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação em um aparelho do tipo Clevenger, e observou-se o teor (%v/m) de 0,05% para as espécies *A. montana* e *P. heptaphyllum*, já para a espécie *X. frutescens* o teor foi de 0,7%. As análises foram executadas através da técnica cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG/EM. A análise do óleo essencial de *A. montana*, apresentou β-pineno (37,69%), α-pineno (6,29%), limoneno (5,96%), (E)-cariofileno (17,55%), β-elemeno (12,68) % e biciclogermacreno (6,16%) como sendo os constituintes majoritários. A análise do óleo essencial de *P. heptaphyllum* apresentou como os constituintes majoritários α-pineno (16,03%), limoneno (4,76%), (E)-cariofileno (21,78%), 7-epi-α-selineno (8,97%), γ-amorfeno (5,87%), óxido de cariofileno 5,98% e espatulenol (4,60%). O óleo essencial de *X. frutescens* apresentou o (E)-cariofileno (34,53%), *trans*-muurola-4(14),5-dieno (7,48%), α-copaeno (6,21%), δ-cadineno (5,67%) e *trans*-β-guaiano (5,08%), como seus constituintes majoritários. Os óleos essenciais das espécies *A. montana*, *P. heptaphyllum* e *X. frutescens* foram submetidas a testes biológicos com larvas do mosquito *Aedes aegypti*, sendo que os óleos essenciais de *P. heptaphyllum* e *X. frutescens* apresentaram atividades larvicida, com CL_{50} de 112,878 ± 0,730 µg/mL e de 143,606 ± 0,894 µg/mL. O óleo essencial de *Annona montana* não apresentou atividade larvicida. Na avaliação citotóxica *IN VITRO*, o óleo

essencial de *P. heptaphyllum* apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais MCF-7, NCI-H292 e HCT 116, apresentando CI_{50} de 44,25 µg/mL, 62,38 µg/mL e 18,63 µg/mL, respectivamente. Em testes citotóxicos do óleo essencial de *Xylopia frutescens* contra as linhagens de células tumorais MCF-7 e NCI-H292 observou-se uma CI_{50} de 58,79 µg/mL e 41,19 µg/mL, respectivamente. O óleo essencial de *Annona montana* apresentou uma CI_{50} > 80 µg/mL, sendo considerado inativo contra as três linhagens de células tumorais testadas

Palavras-chave: Óleo essencial, *Annona montana, Protium heptaphyllum, Xylopia frutescens, Aedes aegypti,* atividade citotóxica.

ABSTRACT

Keywords:

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Produtos naturais: Fonte para obtenção de princípios ativos 2

1.2 Óleos essenciais 3

1.3 Metabólitos secundários 4

1.4 A Floresta Nacional do Ibura 6

1.5 Revisão da literatura 6

1.5.1 Família Annonaceae 6

1.5.2 Família Burseraceae 10

2 OBJETIVOS 11

2.1 Geral 11

2.2 Específicos 12

3 MATERIAIS E MÉTODOS 12

3.1 Obtenção do material vegetal 12

3.2 Processo de secagem e moagem das folhas 13

3.3 Procedimento para obtenção do óleo essencial das amostras 13

3.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) 13

3.5 Identificação dos constituintes 14

3.6 Ensaios biológicos 14

3.6.1 Ensaios larvicida sobre *Aedes aegypti* 14

3.6.2 Ensaios anticolinesterase 15

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 15

4.1 Caracterização química dos óleos essenciais de *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens* 15

4.1.1 Análise do óleo essencial de *Annona montana* 20

4.1.2 Análise do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* 22

4.1.3 Análise do óleo essencial de *Xylopia frutescens* 23

4.2 Atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* 24

4.3 Atividade anticolinesterase 24

5 CONCLUSÕES 25

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO 26

7 REFERÊNCIAS 27

Elemento opcional no qual o autor presta homenagem ou dedica seu trabalho para uma ou mais pessoas.

"*Citação relacionada com a matéria tratada no corpo do trabalho (elemento opcional)*"
(Nome do autor)

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.
Figura 2.
Figura 3.
Figura 4.
Figura 5.
Figura 6.
Figura 7.
Figura 8.
Figura 9.

Figura 10.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.
Tabela 2.
Tabela 3.
Tabela 4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO

Os homens sempre buscaram na natureza matéria prima-para a melhoria da qualidade de vida, desde sua alimentação até materiais para confecção de suas vestimentas. Ao longo de sua existência, o ser humano tem utilizado as plantas medicinais como fonte valiosa de recursos terapêuticos com o propósito de aliviar suas dores e curar suas doenças entre outras finalidades [Atasanov, 2015].

Em um breve histórico da humanidade podemos destacar algumas narrativas acerca da utilização de plantas com finalidade medicinal. Há relatos antes de Cristo que descreve uso do ginseng pelos imperadores chineses, tal prática pode ter sido a primeira forma de utilização de plantas medicinais relatada [Yun, 2001]. Ainda na China, o imperador Sheng-Nung antes de sua morte tinha provado 100 ervas, ele descreve em seu "Cânone das Ervas" 252 plantas, muitas ainda em uso na atualidade [Nogueira, 2009].

O alemão e egiptólogo Yorg Ebers em meados de 1873 adquiriu um longo papiro datado de aproximadamente 1500 a.C. que após sua tradução em 1930 passou a ser conhecido como "Papiro de Ebers", um dos mais importantes documentos médico das civilizações do antigo Egito, que catalogou 125 plantas medicinais, 811 prescrições e mais de 7000 drogas mencionadas [Mata, 2009; Almeida, 2011]. Outro documento bastante antigo é o papiro atribuído ao médico egípcio Imhotep (2667 a.C.- 2648 a.C.). Ele tinha a função de chanceler do faraó e sumo-sacerdote do deus-sol Rá, em Heliópolis. É ainda, considerado por muitos, pioneiro na medicina e utilizava ervas medicinais em suas curas [Cukierman, 2010].

Vários textos que abordavam a medicina de forma inovadora foram atribuídos a Hipócrates, que ficou conhecido como "pai da medicina", que relacionava para cada doença o remédio vegetal e o tratamento [Ribeiro, 2005]. Na Roma antiga, o médico de Nero conhecido por Pelácius escreveu em seus estudos sobre mais de 500 espécies de plantas medicinais [Jorge, 2009]. No compêndio denominado "História natural" com 37 volumes e escrito pelo

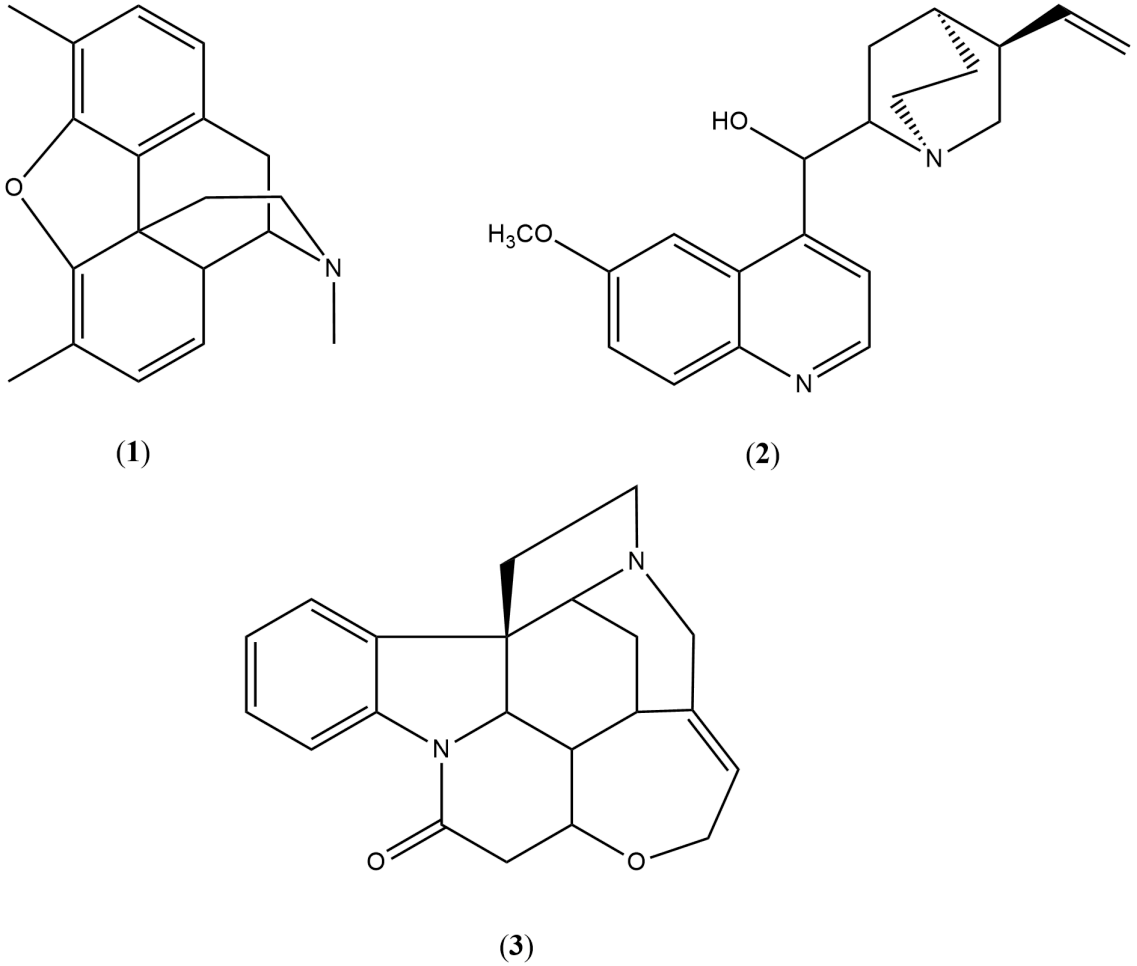
naturalista romano Plínio, “o velho”, cita mil plantas curativas, dentre elas o alho que na época já era indicada para 61 enfermidades. Galeno (130 d.C.-200 d.C.), romano de origem grega, foi considerado o “pai da farmácia” por seu empenho na elaboração de várias formas de uso de ervas medicinais e medicamentos à base de plantas [Abílio, 2011].

Teofrasto (371 a.C.-286 a.C.), em “História das plantas”, classificou os vegetais e suas partes baseado no critério de semelhança e diferença, catalogou 500 espécies vegetais com descrição botânica precisa, acompanhada de efeitos tóxicos e propriedades curativas [Silva, 2016]. O médico e farmacêutico grego Dioscórides, considerado o pai da farmacologia, enumerou em seu tratado, “De Matéria Médica”, mais de 500 plantas medicinais e seus usos, relatando ainda informações sobre botânica e produtos farmacêuticos [Alvarez, 2017].

Após a queda do império romano e o fortalecimento da igreja católica, na idade média, estabeleceu um marco de estagnação nos estudos das plantas medicinais por um longo período. Isso se deu porque a igreja católica era contrária ao desenvolvimento dos conhecimentos científicos, já que nessa época foi marcada pela magia e pela feitiçaria que frequentemente confundem-se com a ciência [Abílio, 2011].

No século XIII, com o surgimento das escolas de Salerno e Montpellier na Europa, o assunto sobre plantas medicinais é retomado abrindo as portas do conhecimento para os leigos, que até então era restrito para os monges e religiosos [Garcia, 2014; Waisse, 2010]. Somente no século XVIII as propostas científicas tornaram-se mais sólidas para o uso de fitofármacos a partir do isolamento e estudo de alguns metabólitos. O isolamento das primeiras substâncias puras a partir de extratos vegetais foram alguns ácidos orgânicos (oxálico, málico e tartárico) e alcaloides. É desta época o isolamento da morfina (**1**) (1806), quinina (**2**) (1820) e estriquinina (**3**) (1820) [Almeida, 2011; Pinto, 2002; Oliveira, 2009].

Figura 1: Estrutura química da morfina (**1**), quinina (**2**) e estriquinina (**3**).



(**1**) (**2**)

(**3**)

Em 1809 surgiram as primeiras publicações sobre o efeito de *Strychnos*, um gênero botânico rico em alcaloides, em animais de laboratório. Contudo, é conferido a Claude Bernard (1813-1878) o mérito de estudar através de ensaios laboratoriais com animais as atividades de plantas usadas na medicina popular [Almeida, 2011].

O primeiro relato de utilização de plantas medicinais nas Américas datado do século XVI, foi o Manuscrito de Badanius, herbário asteca, em Nahuatl. Já no Brasil as plantas medicinais foram primordialmente utilizadas pelos índios em seus ritos de cura e adoração. Os pajés transmitiam o conhecimento acerca das ervas locais e suas utilizações aprimoradas a cada geração. Com a chegada dos colonizadores portugueses ao Brasil, se

depararam com uma grande quantidade de plantas medicinais que eram usadas pelos povos indígenas que viviam aqui. Então houve a fusão dos conhecimentos da flora local, com aqueles trazidos da Europa pelos portugueses e dos povos africanos que vieram como escravos da África [Giraldi, 2010; Monteiro, 2017].

Entre os anos de 1560 e 1580 o jesuíta padre José de Anchieta fez anotações e observações do uso frequente de ervas pelos índios, detalhando melhor quais as plantas seriam comestíveis e medicinais do Brasil em suas cartas ao Superior Geral da Companhia de Jesus [Abílio, 2011]. Segundo Monteiro 2017, o padre José de Anchieta foi o primeiro boticário de Piratininga, atual cidade de São Paulo. A Real Botica de São Paulo foi a primeira farmácia oficial da cidade em 1765. Os medicamentos eram, em sua grande maioria, plantas medicinais.

A criação do jardim botânico de ajuda em 1768 tornou-se importante aporte de informações sobre a descrição e cultivo de plantas enviada pela colônia do império português. Formando assim, um núcleo de fomento a investigação e orientação de produtos com potenciais terapêuticos e com retorno econômico, não apenas em Portugal, mas entre capitanias, sob tutela portuguesa [Peixoto, 2010].

A partir do trabalho de Rodolpho Albino Dias da Silva, que se ateve em repassar para um livro toda uma vida de pesquisa sobre drogas vegetais, descrição de produtos químicos e de preparações oficinais, surgindo assim, a primeira Farmacopeia Brasileira em 1926, com 183 espécies de plantas medicinais brasileiras [ANVISA, 2010].

Em meados do século XX, a medicina tradicional foi vista como atraso tecnológico e foi sendo substituído pelo uso de medicamentos industrializados. Atualmente, seguindo as tendências mundial de uma preocupação com a biodiversidade e o fomento as ideias sustentáveis, foram concebidos novos ares aos estudos de plantas medicinais, que despertou um grande interesse geral na fitoterapia.

Aedes aegypti

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), é o principal vetor que transmite o vírus causador das doenças como a dengue, a febre amarela, a Chikungunya e o Zica vírus [OMS, 2018]. Entre as doenças citadas, a dengue é a mais antiga relatada que foi distribuída nos trópicos em todo o mundo durante os séculos XVIII e XIX, quando as indústrias de navegação e comércio estavam se expandindo. O mosquito *Aedes aegypti* manteve seu ciclo reprodutivo usando água armazenada nos navios, mesmo em viagens mais longas, mantendo assim a continuidade de transmissão dos vírus [Gubler, 2002].

A chegada do *Aedes aegypti* no Brasil se deu no século XIX através de navios utilizados para transporte de pessoas. A febre amarela foi a primeira preocupação de ordem de saúde pública acerca das doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti* no Brasil, nessa época o combate do mosquito foi feito com utilização de inseticidas químicos, o que posteriormente fez com que o vírus criasse resistência, tornando assim mais difícil sua erradicação no país [Guterres, 2016; Gomes, 2016].

O Rio de Janeiro foi o primeiro local do Brasil a eliminar o *Aedes aegypti*. A cidade foi afligida por vários surtos de febre amarela entre 1850 e 1902, vitimando 58 mil pessoas. Forças tarefas coordenadas por Oswaldo Cruz, com o intuito de exterminar o mosquito obteve sua primeira vitória em 1903, não ocorrendo mais mortes pelos próximos seis anos [Gomes, 2016].

Com o intenso fluxo migratório rural-urbano, que geraram um crescimento desordenado nas cidades e com a ausência de boas condições de saneamento básico ocasionaram a reemergência de doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti.* Entre as décadas de 1930 e 1940, com o apoio da fundação Rockfeller, foram executadas campanhas de erradicação do *Aedes aegypti* em cidades litorâneas do nordeste brasileiro assim como vinha se desenvolvendo em outros países da América [Braga, 2007].

Após várias tentativas de erradicação do *Aedes aegypti* utilizando inseticidas químico sem muito sucesso, em julho de 2001, a Funasa abandonou oficialmente a meta de erradicar o mosquito e passou a trabalhar com o objetivo de controlar o vetor [Braga, 2007]. Nesse âmbito, novos métodos de controle do vetor (larvitrampas, armadilha de ovoposição, armadilha para captura de adultos, atraente de ovoposição sintético) e o desenvolvimento de vacinas para doenças transmitidas pelo mosquito começaram a receber mais atenção dos estudioso e investimentos do governo [Fahimi, 2018; Funasa, 2001].

Surgem também estudos voltado a plantas com o objetivo de encontrar fontes naturais de substâncias com potencial inseticida e antimicrobiana contra o vetor da dengue. Nas últimas décadas, a utilização de óleos essenciais e extratos vegetais de diversas plantas mostraram elevado potencial como agente de mortandade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* [Voris, 2017]. Para uma substância ser usada como bioinseticida precisa apresentar algumas propriedades como: serem facilmente extraíveis, biodegradáveis, baixa toxidade contra mamíferos, eficaz em pequenas concentrações e ausência de fitotoxidade [Costa, 2017].

Diante do exposto, o presente estudo visa agregar informações inerentes ao combate da larva do mosquito *Aedes aegypti* com a realização de testes dos óleos essenciais extraídos das espécies *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frustescens* como agentes de mortandade larvicida e seus efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais.

Produtos naturais: Fonte para obtenção de princípios ativos

Um produto natural é um composto químico ou uma substância produzida por um ser vivo encontrado na natureza e que em geral apresenta alguma atividade biológica. Nos casos de plantas, esse produto pode ser usado em sua totalidade como fitoterápico ou ainda pode fornecer uma ou mais

substâncias que venham a serem responsáveis pelo desenvolvimento de medicamentos sintéticos [Atasanov]. Segundo o Ministério da Saúde, uma planta medicinal é uma espécie vegetal utilizada com fins terapêuticos, podendo ser cultivada ou não. Já fitoterápico, é uma ação terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal [BRASIL].

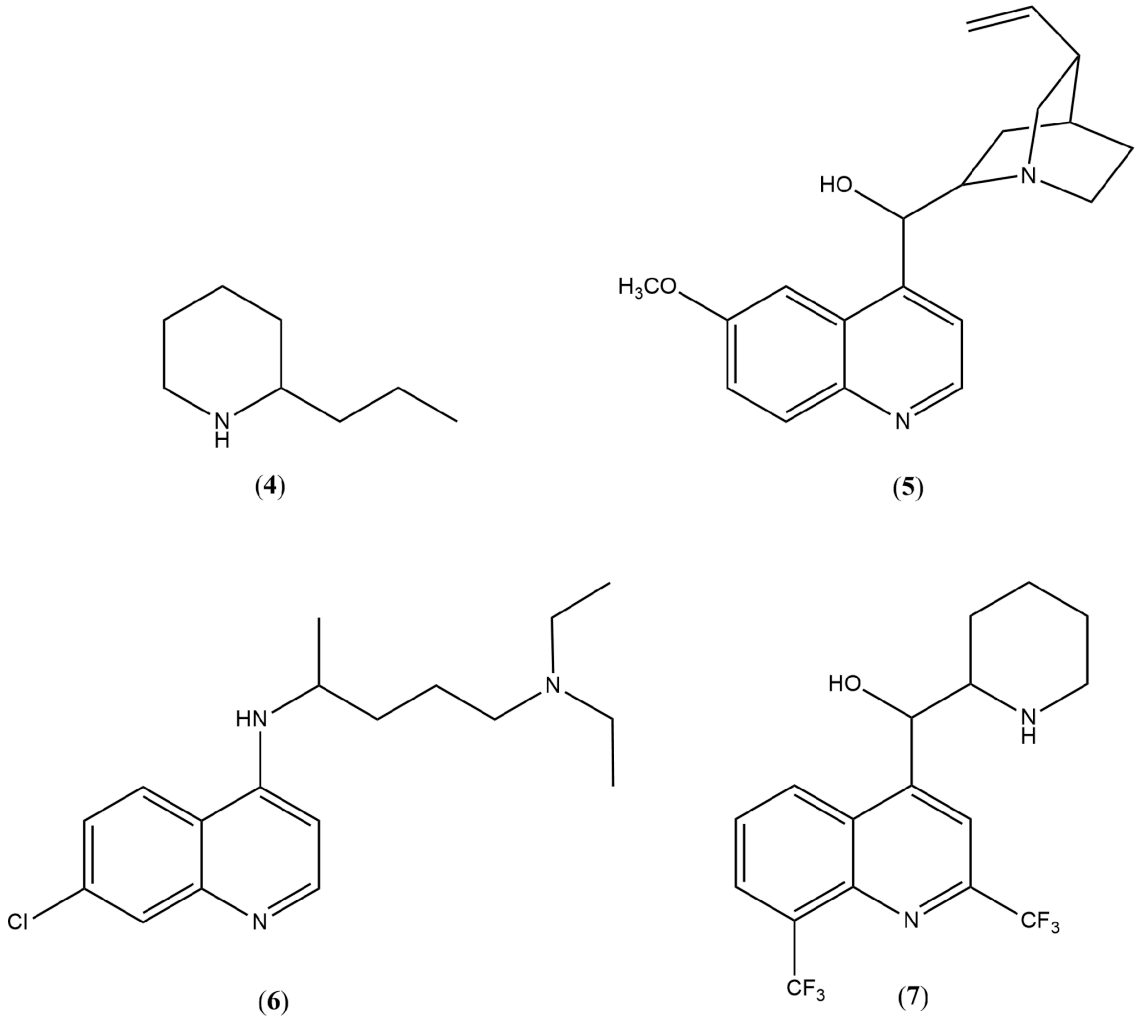
Atualmente, o foco das pesquisas para obtenção e caracterização dos produtos naturais é concentrada principalmente em plantas, os micro-organismos, a exemplo dos fungos, constituem a segunda fonte de recursos biológicos explorados e os seres marinhos ficam em terceiro lugar, os quais continuam menos explorados por alguns fatores que dificultam tal estudo, dentre eles: as coletas biológicas marinhas apresentam um elevado custo, o acesso ao bioma marinho são muito restritos, e poucos profissionais dispostos a confrontar o desafio de isolar compostos polares, que requer técnicas mais dispendiosas [Berlinck].

Séculos atrás, a procura por produtos naturais, a qual seu sucesso geralmente baseava-se no método da tentativa e erro, nos direcionaram a grandes descobertas que propiciaram a evolução da indústria farmacêutica. Muitos são os relatos do papel dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos. Podemos aludir o uso de rapés e bebidas alucinógenas que eram bastante utilizadas em práticas religiosas e mágicas por povos antigos, o filósofo grego Sócrates foi executado após ingestão de uma bebida à base de cicuta, que possui um alcaloide como princípio ativo denominado coniina (**4**) [Viergas Jr 2006].

Outro fato se passa no Peru em 1630 durante a colonização espanhola, através dos índios os jesuítas tomaram conhecimento da utilização da casca seca de espécies de *Cinchona* no tratamento de febre. Passados quase duzentos anos, em 1830, dois professores da Escola de Farmácia de Paris, Pierre Joseph Pelletier e Joseph Caventou isolaram a quinina (**5**) da casca da *Cinchona*, que durante mais de 300 anos foi o único princípio ativo eficaz

contra a malária. A quinina foi a substância responsável pelo desenvolvimento dos antimaláricos sintéticos cloroquinina (**6**) e primaquinina (**7**), após a II guerra mundial [Agosta, 1997].

Figura 2 - Estrutura da coniina, quinina e alguns antimaláricos sintéticos.

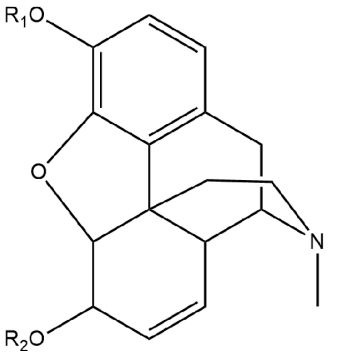


(**4**) (**5**) (**6**) (**7**)

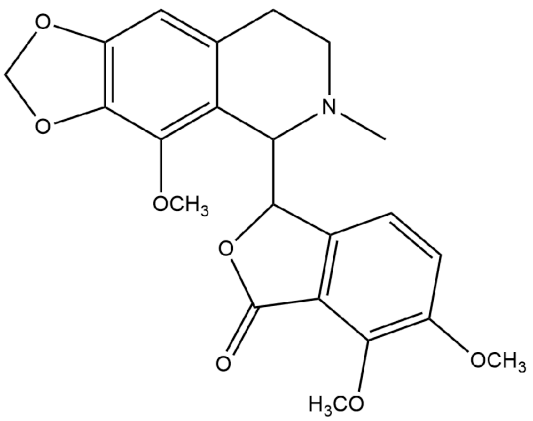
O ópio é conhecido há séculos por suas propriedades saporíferas e analgésicas, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, sendo utilizada desde a época dos Sumérios. Em 1804, Armand Séquin isolou a morfina (**8**) a partir do ópio. Outros alcaloides são produzidos do ópio com propriedades

variadas, por exemplo, da codeína (**9**) (antitussígeno), a tebaína (**10**) (antagonista da morfina), a narcotina (**11**) (antitussígeno e espasmolítico) e a papaverina (**12**) (espasmolítico) [Viergas Jr, Barreiro].

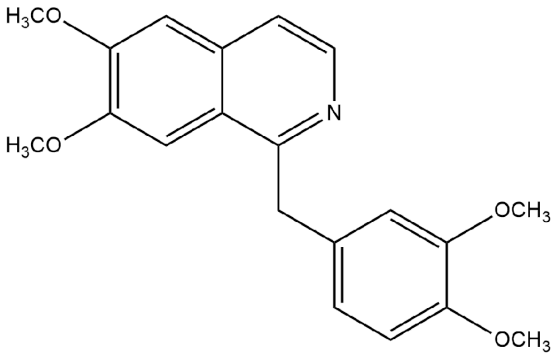
Figura 3 - Estrutura química de alguns opióides.



(**8**) $R_1 = H$, $R_2 = H$
(**9**) $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$
(**10**) $R_1 = CH_3$, $R_2 = CH_3$



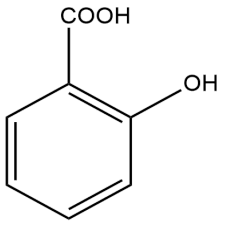
(**11**)



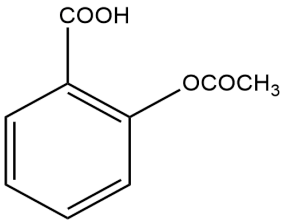
(**12**)

Em 1898, Felix Hofmann na busca pela cura da artrite que afligia seu pai, que sentia de forma acentuada os efeitos colaterais do salicilato de sódio, descobriu o ácido acetilsalicílico (**13**), sendo menos ácido que o ácido salicílico (**14**), porém mantendo a propriedade analgésica [Agosta].

Figura 4 - Estrutura química de dois importantes salicilatos.



(**13**)



(**14**)

Wall, Wani e colaboradores relataram o isolamento da camptotecina a partir da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*. O taxol e a camptotecina são agentes anteneoplásicos bastante conhecidos e ambos possuem o mesmo uso terapêutico [Orbelius].

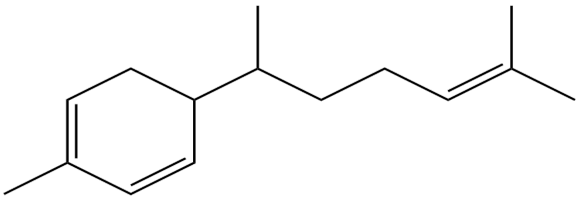
Diante desses fatos, é imprescindível a unificação do progresso científico com aquilo que a natureza oferece, respeitando os parâmetros legais, as culturas dos povos em torno do uso de produtos e ervas medicinais com o intuito de curar os males que aflige a humanidade.

Óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser definidos principalmente como compostos aromáticos voláteis, com uma grande complexidade de constituintes, formada mais comumente por duas classes distintas, denominadas terpenoides e fenilpropanoides. Esses compostos ficam armazenados em estruturas secretoras, conhecida em biologia por células parenquimáticas diferenciadas, bolsas esquizógenas e canais oleíferos. Também podem ser encontrados em estruturas secretoras externas conhecidas por tricomas glandulares [Biasi].

As estruturas secretoras podem ser localizadas em várias partes das plantas, nas folhas, flores e caules que apresentam maior número de incidência dessas estruturas, em menor proporção, são encontradas em raízes, sementes e rizomas. Do óleo essencial do *Zingiber officinale* (gengibre), que é um exemplo de rizoma, apresenta o zingibereno (**15)** como constituinte majoritário e possui atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* [Biasi, Figueiredo e Gomes].

Figura 5 - Principal princípio ativo do óleo essencial do gengibre.



(**15**)

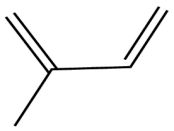
O método utilizado para a extração do óleo essencial varia a depender da parte da planta utilizada e a finalidade pretendida, sendo as técnicas mais utilizadas a hidrodestilação e destilação por arraste a vapor para a maioria dos materiais botânicos [Yusoff]. Segundo Morais [Morais], a composição química dos óleos essenciais pode sofrer alterações a depender da influência de alguns fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época do ano e horário da coleta.

Na produção industrial e farmacêutica dentre outras, esses fatos devem ser levados em consideração, já que, a abundância de um ou mais constituintes, confere uma devida atividade a um produto específico [Elechosa, Mastro]. Portanto, é necessária a continuidade dos estudos acerca dos óleos essenciais, sempre visando melhorias no processo de obtenção, não só dos óleos de espécies já conhecidas, mas também de novas espécies que venham a ser descobertas.

Biossíntese dos terpenóides

Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo sintetizados a partir de unidades de 5 carbonos, denominado isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (**16**) [Dewick].

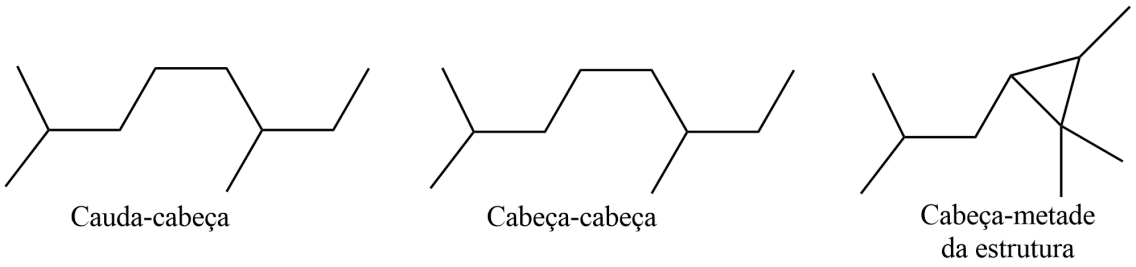
Figura 6 - Estrutura do isopreno.



(**16**)

Os isoprenos envolvidos na síntese dos terpenóides são o isopentenil fosfato (IPP) e o dimetil alil fosfato (DMAPP), unidos predominantemente no sentido cauda-cabeça, sendo menos frequente no sentido cabeça-cabeça e cabeça-metade da estrutura [Biasi].

Figura 7 - Arranjos estruturais que ocorrem com o isopreno gerando os terpenos.

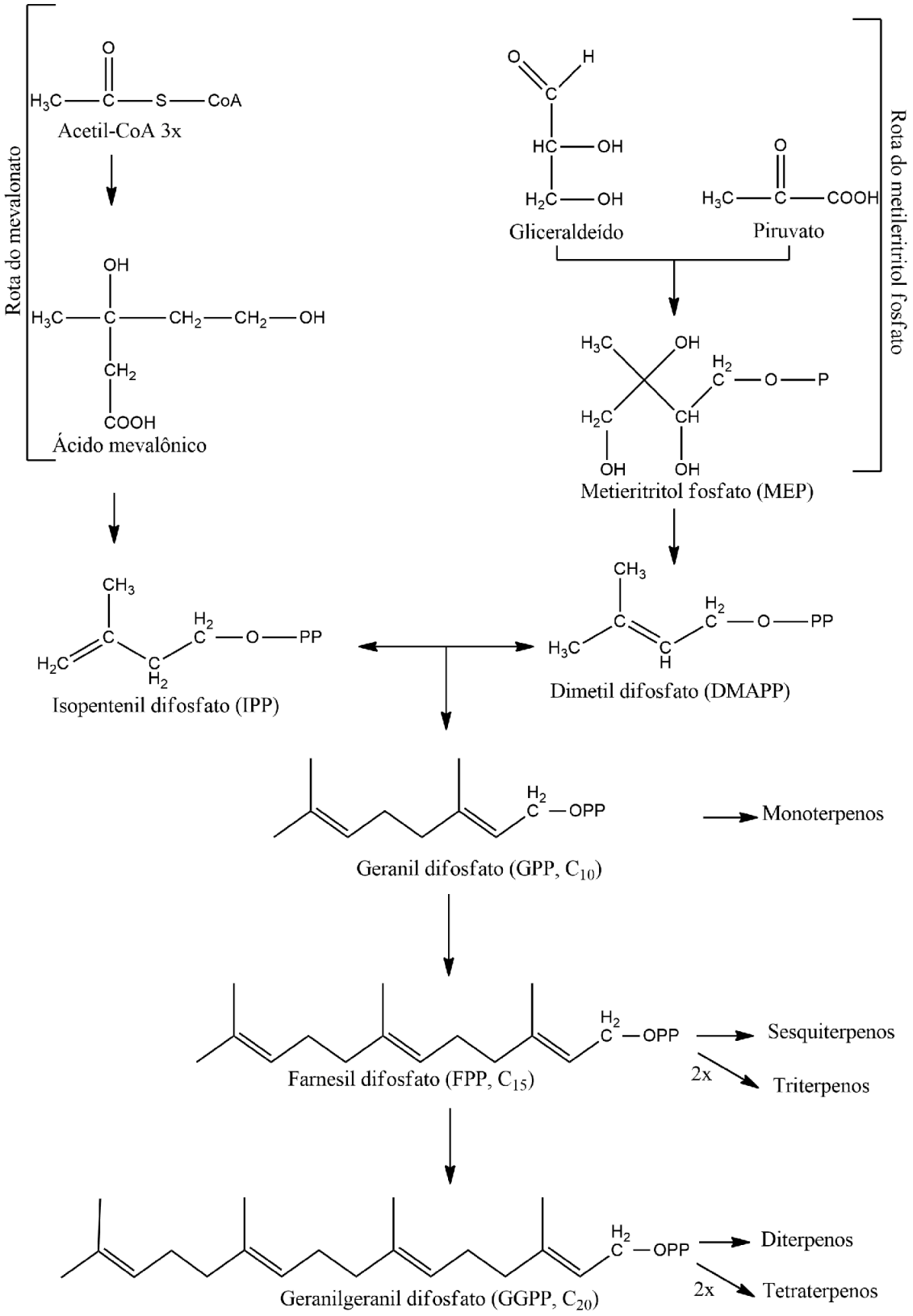


Típicas estruturas que contém esqueletos de carbonos representados por $(C_5)n$ são classificados como hemiterpenos (C_5- 5 carbonos), a partir da união entre IPP e DMAPP são formados os monoterpenos (C_{10}- 10 carbonos), sesquiterpenos (C_{15}- 15 carbonos), diterpenos (C_{20}- 20 carbonos), sesterpenos (C_{25}- 25 carbonos), triterpenos (C_{30}- 30 carbonos) e tetraterpenos (C_{40}- 40 carbonos) [Dewick].

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas distintas. No citoplasma segue a rota do mevalonato, três moléculas de acetil-CoA são ligadas para formar o ácido mevalônico, e este após sofre reações de fosforilação, descarboxilação e desidratação produz isopentenil difosfato (IPP). Este composto se converte em seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), o qual é biossintetizado através de um conjunto de reação denominada rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos [Taiz 2004, Bartram 2006].

Figura 8 - Esquema da biossíntese dos terpenos por duas rotas metabólicas e a classificação de terpenos contendo 10 a 40 carbonos. **Fonte:** Taiz e Zeiger

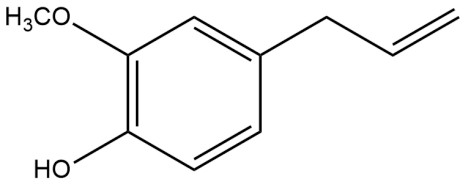
2004.



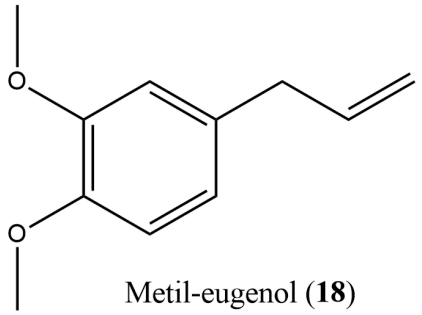
Biossíntese dos fenilpropanoides

Conquanto os fenilpropanoides não sejam compostos tão comuns na maioria dos óleos essenciais, algumas espécies apresentam proporções significativas de tais compostos. Entre os mais conhecidos temos: o eugenol (**17**), metil-eugenol (**18**), cavicol (**19**), metil-cavicol (**20**) e metil-cinamato (**21**), todos esses compostos podem ser encontrados em quimiotipos de espécies do gênero *Ocimum* [Biasi].

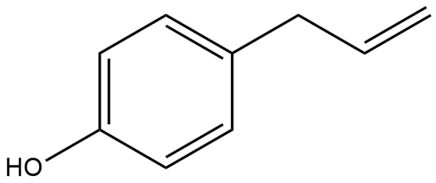
Figura 9 – Estrutura de compostos químicos encontrados no gênero *Ocimum*.



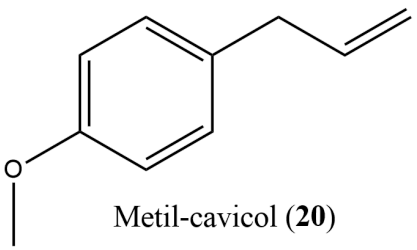
Eugenol (**17**)



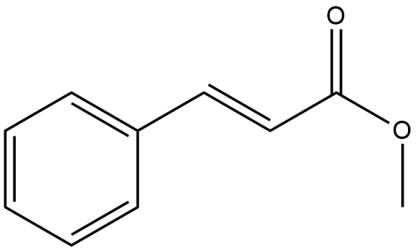
Metil-eugenol (**18**)



Cavicol (**19**)



Metil-cavicol (**20**)

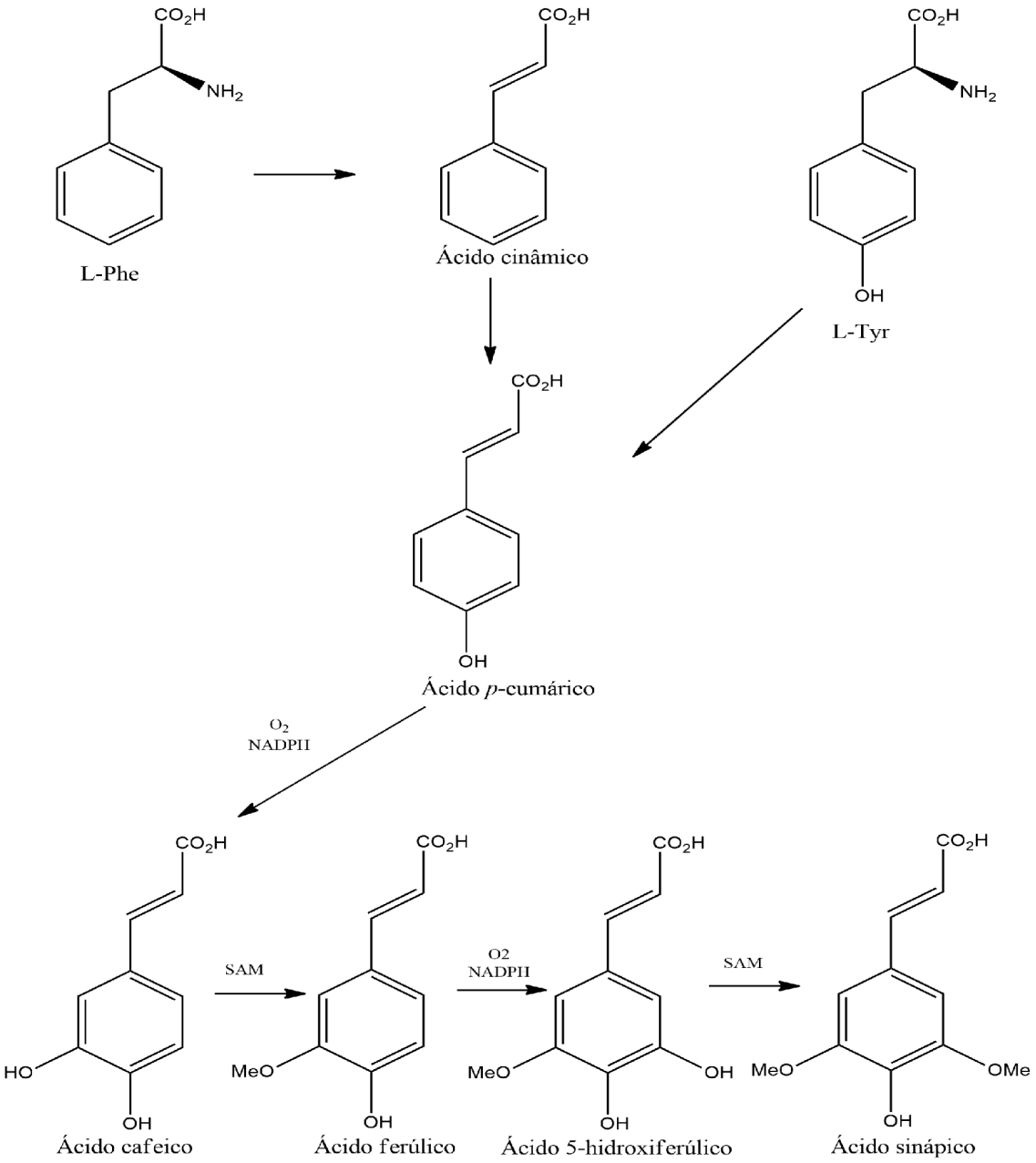


Metil-cinamato (**21**)

Os aminoácidos fenilalanina e tirosina são precursores dos fenilpropanoides. Em plantas o primeiro passo que ocorre com a fenilalanina é a eliminação de amônia da cadeia lateral, originando o ácido cinâmico, este por

sua vez, após adição de uma hidroxila se transforma em ácido *p*-cumárico, que serve como substrato para diferentes enzimas produzindo o ácido cafeico, ácido coumaril, ácido ferúlico, ácido 5-hidroxiferúlico e o ácido sinápico [Dewick].

Figura 10 – Biossíntese de fenilpropanoide a partir da fenilalanina e tirosina.

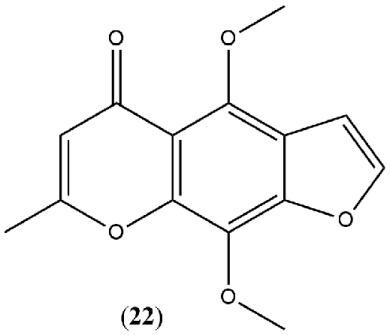


Metabólitos secundários

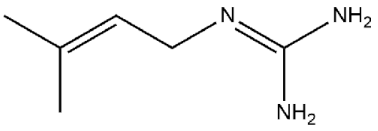
Os metabólitos secundários são compostos derivados de matabólitos primários, que não estão diretamente envolvidos no processo de crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta, mas apresentam diversificadas aplicações fisiológicas, como exemplo da forte interação das plantas com o meio ambiente para a sua sobrevivência. Com base na rota, os metabólitos secundários são classificados em três classes principais: terpenos, compostos fenólicos (fenilpropanoides e flavonoides) e compostos contendo nitrogênio (alcaloides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos [Verma].

As aplicações práticas dos metabólicos secundários têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio da indústria de medicamentos, alimentos e cosméticos [**Cragg**]. Alguns exemplos são relevantes dentro dessas práticas, como o princípio ativo oriundo da planta *Ammi visnaga* (L) Laamk, o Khellin (**22**), composto classificado como uma gama-pirona, que possibilitou o desenvolvimento do cromolyn, também conhecido como ácido cromoglícico (**23**), usado como broncodilatador. Da espécie *Galega officinalis*, temos a galegina (**24**), um derivado da guanidina e foi modelo para síntese de uma biguanida denominada metmorfina (**25**) e outros fármacos antidiabéticos. Da *Papaver somniferum*, extraiu-se a papaverina (**26**), um alcaloide que constitui a base para síntese do verapamil (**27**), seu emprego é uma alternativa em casos de emfermidades vasculares [Atasanov].

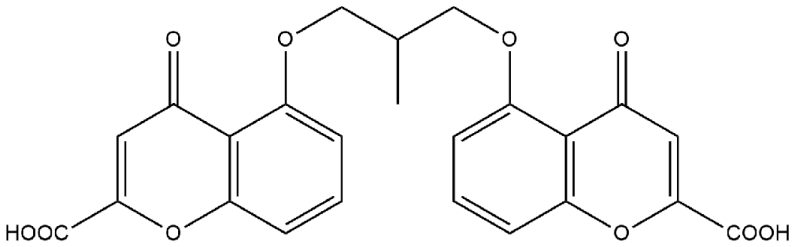
Figura 11 – Estrutura de alguns princípios ativos utilizados na indústria farmacêutica.



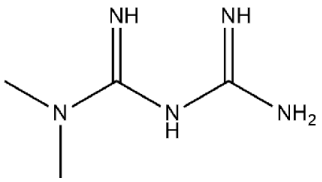
(**22**)



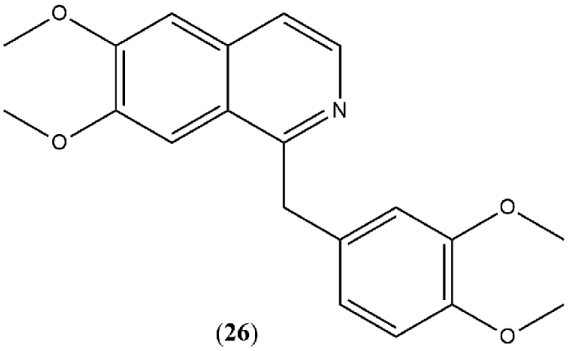
(**24**)



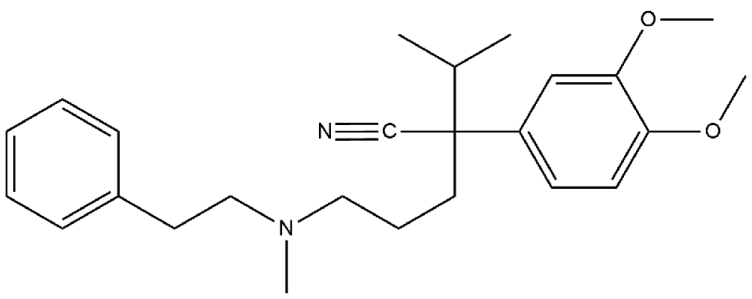
(**23**)



(**25**)



(**26**)



(**27**)

Mais de 60% dos fármacos provêm de produtos naturais ou de algum de seus derivados sintéticos, o que denota a importância da química de produtos naturais e sua influência em novas sínteses na descoberta de novos fármacos [Verna].

A floresta Nacional do Ibura

A Floresta Nacional do Ibura, é situada às margens da rodovia BR 101 km 85, no município de Nossa Senhora do Socorro, em Sergipe com uma área de 144 mil e 17 hectares. De grande valor ecológico, pois é rica em recursos florestais é um local necessário a manutenção do banco de sementes de espécies florestais nativas, inclusive do bioma mata atlântica em associação com manguezal, além da manutenção e proteção dos recursos florestais e da biodiversidade, recuperação de áreas e pesquisa científica [**Clipping**].

A degradação ambiental associada às obras de infraestrutura como abertura de rodovias, construção de usinas hidrelétricas, têm causado a perda da variabilidade genética das plantas de diversas espécies, as quais são potencialmente úteis no desenvolvimento de novos medicamentos e produtos e apresentam um valor inestimável para as próximas gerações. Para tanto, é essencial conhecer os ecossistemas, os processos naturais e as interferências antrópicas, positivas ou negativas, que influenciam, considerando o uso que o homem faz do território, analisando os aspectos pretéritos e os impactos atuais ou futuros de forma a elaborar meios para conciliar o uso dos espaços [**Planos de manejos**].

Dessa forma, conhecendo melhor o ambiente é possível estabelecer formas adotadas para garantir a preservação da fauna e flora destas Unidades de Conservação (UCs), embora a mesma tenha sido estabelecida por lei, as interferências são observadas e agressões podem causar prejuízos ao meio ambiente e sua biodiversidade. A criação de uma UCs geralmente se dá quando há uma demanda da sociedade para proteção de áreas de importância biológica e cultural ou de beleza cênica, ou mesmo para assegurar o uso sustentável dos recursos naturais pelas populações tradicionais. É importante

que a criação de uma UCs leve em conta a realidade ambiental local, para que exerça influência direta no contexto econômico e socioambiental [**Criação de UCs**].

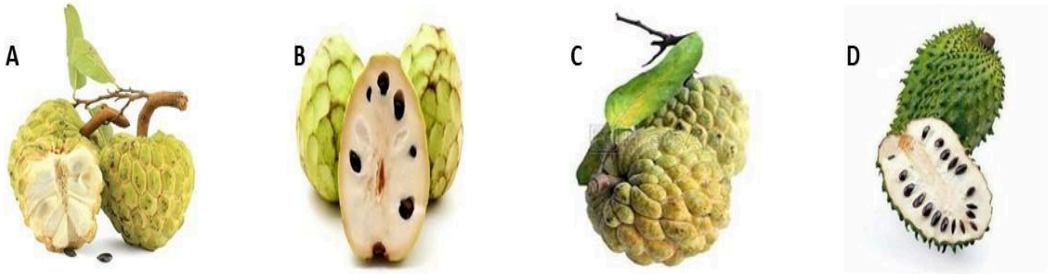
Revisão da literatura

Família Annonaceae

A família Annonaceae é composta por cerca de 35 gêneros e mais de 2500 espécies, possui distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo, sendo o gênero *Annona* o mais estudado e importante com mais de 50 espécies, seguido do gênero *Cananga* e *Rollinia* [Kiill, Nunes]. A única representante desse grupo fora dos trópicos é a *Asimina triloba,* uma pequena árvore que ocorre desde o norte do Canadá até o sul da América do Norte [Krinski].

Os integrantes dessa família geralmente são plantas lenhosas, de porte arbóreo ou arbustivo. Algumas espécies do gênero *Annona* despertam interesse comercial relacionado a seus frutos, que são conhecidos popularmente como graviola (**D**) (*A. muricata*), fruta condessa (**C**) (*A. reticulata*), pinha (**A**) (*A. squamosa*), cherimoia (**B**) (*A. cherimola*) dentre outras, que são amplamente cultivadas e comercializadas em todo o Brasil [Formagio].

Figura 12 – Espécie de frutas do gênero *Annona*. (Pinha (A), Cherimoia (B), Fruta condessa (C) e graviola (D)) **Fonte:** http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/anonaceas/index.htm. (Acesso em 14/05/2018).



Este grupo de plantas também tem reconhecida importância farmacológica e industrial, sendo utilizadas nos setores de cosméticos e perfumaria [Krinski]. Na medicina popular suas folhas são usadas para dores de cabeça, insônia, cistite, diabetes, hipertensão, problemas no fígado e como anti-inflamatório [Silva 2015].

É uma família muito rica na biodiversidade de substâncias químicas que possuem propriedades farmacológicas atribuída à presença de alcaloides e, mais recentemente, a acetogeninas e flavonoides, principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos das annonaceae, fato que demonstra a eficácia do uso de várias partes das plantas dessa família na medicina popular [Formagio 2010].

Os estudos fitoquímicos realizados sobre os gêneros *Xylopia* e *Annona* concentram-se tanto na obtenção de extratos quanto na extração de óleos essenciais, onde muitos autores buscam referendar seus estudos de modo a contribuir ao uso seguro para tratamentos a base de plantas oriundos desses gêneros no uso tradicional e nos processos industriais [Formagio 2013, Moscoso].

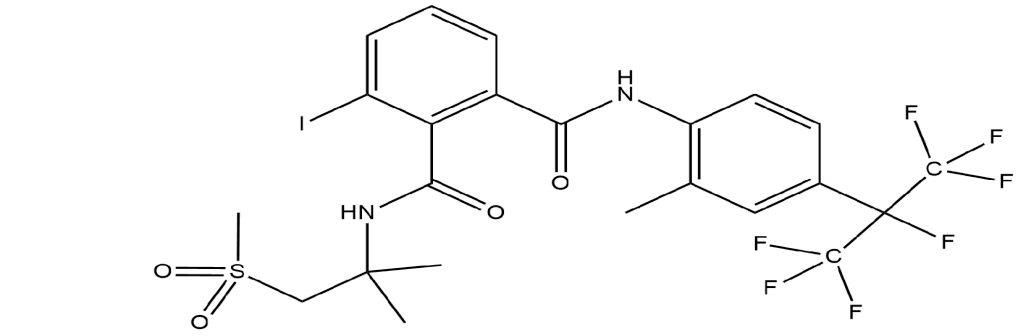
Formagio *et al.* [Formagio 2013] analisaram o potencial anti-inflamatório do óleo essencial obtido das folhas de *Annona sylvatica*. Através dos testes de inflamação induzida por CFA realizados pelos autores, em ratos, que consistiam no uso oral diário de 200 mg/Kg do óleo essencial de *Annona sylvatica*, foi possível observar a inibição do edema em 39%, enquanto um medicamento padrão conhecido por dexametasona, aplicado por injeção subcutânea (0,5 mg/kg), reduziu o edema em 45%. Sendo assim, os autores demonstraram um grande grau de satisfação já que o uso do óleo essencial da *Annona sylvatica* não teve efeitos colaterais indesejáveis, possibilitando o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios [Formagio 2013].

Em trabalho publicado por Moscoso *et al.* [Moscoso], estudando o efeito citotóxico do extrato dos frutos imaturos de *Annona montana* em cinco linhas de células tumorais humanas, foi observado que os extratos obtidos induziram danos no DNA em células normais, enfatizando-se assim, que medicamentos

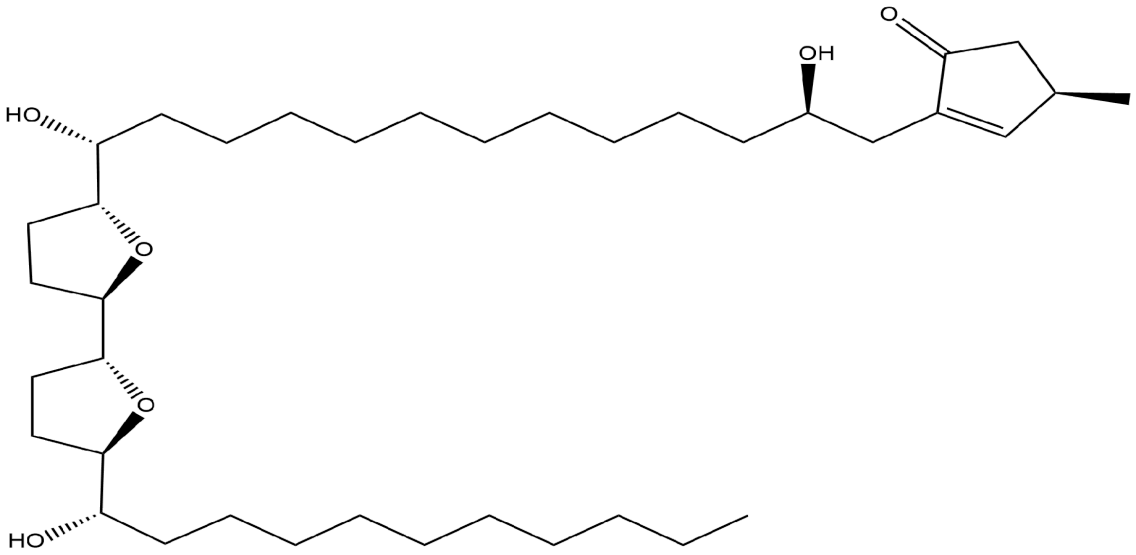
populares tradicionais preparados a partir de extratos do fruto de *Annona montana* devem ser usados com cautela [Moscoso].

Souza *et al.* [Souza 2017], objetivando avaliar a eficácia da atividade inseticida dos extratos etanólicos das sementes de cinco espécies do gênero *Annona* (*montana, mucosa, muricata, reticulata* e *sylvatica*), observaram que o extrato etanólico de *A. mucosa* apresentou o resultado mais promissor dentre as analisadas, causando 100% de mortalidade das larvas de *Helicoverpa armígera*. Os autores afirmam que sua atividade foi comparável à flubendiamida (**28**) e inseticidas a base de acetogenina. Nesse estudo, os autores também isolaram a rolliniastatina-1 (**29**), um composto da classe das acetogeninas, biossintetizada pela via do acetato e encontrada com frequência nos frutos das espécies das Annonaceae, que na concentração de 41,55 mg/L causou mortalidade total das larvas de *Helicoverpa armígera*, que na fase de lagarta causa grande prejuízos atacando principalmente lavouras de soja, milho e algodão. Resultados como esses indicam que as Annonaceae são possíveis fontes de substâncias alternativas para controle de *Helicoverpa armígera* [Souza 2017, Ribeiro 2016].

Figura 13 – Estrutura da flubendiamida (**28**) e rolliniastatina-1 (**29**).



(28)



(29)

Takahashi *et al*. [Takahashi] investigaram em seus experimentos a atividade antimicrobiana de 16 extratos de seis plantas do gênero *Annona* e *Xylopia* que são utilizados na medicina popular no Brasil. Seis extratos (hexanólico de *Xylopia frutescens*, etanólico de *Xylopia frutescens*, etanólico de *Xylopia amazônica*, clorofórmico de *Xylopia amazônica*, benzênico de *Annona ambotay* e etanólico de *Annona cherimólia*) apresentaram atividade antimicrobiana a pelo menos um dos micro-organismos testados na concentração de 10mg/mL. Todos os extratos foram ativos contra *Bacillus subtilis*, apenas três (etanólico de *Xylopia frutescens*, *Annona ambotay* e etanólico de *Annona cherimólia*) foram ativos contra *Staphylococcus aureus,* mas nenhum dos extratos demostraram serem ativos contra *Escherichia coli*,

Micrococcus luteus e *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse estudo os autores ainda isolaram o ácido xilópico da *Xylopia sp*. que já era conhecido por possuir atividade antibacteriana [Takahashi, Iwu].

Em estudos realizados por Ferraz *et al.* [Ferraz 2013], a fim de constatar a citotoxicidade do óleo essencial de *Xylopia frutescens* realizaram testes em três linhas celulares de tumores humanos (PC-3M, OVCAR-8 e NCI-H358M). O óleo essencial de *Xylopia frutescens* apresentou valores de CL_{50} variando de 24,6 a 40,0 µg/mL para as linhagens celulares NCI-H358M e PC- 3M respectivamente. O medicamento doxorrubicina, usado como controle positivo, apresentou valores de 0,9 a 1,6 µg/mL para as linhagens celulares NCI-H358M e PC-3M respectivamente. Segundo os autores, valores de CL_{50} abaixo de 30 µg/mL são considerados promissores para o desenvolvimento de drogas anticâncer [Ferraz 2013].

Família Burseraceae

Burseraceae é uma família angiospérmica que compreende cerca de 20 gêneros e aproximadamente 600 espécies distribuídos nas regiões tropicais pelo planeta [Souza 2015]. Uma característica muita marcante dos membros dessa família é a presença de canais secretores de resina aromática associado ao floema. Algumas de suas espécies possuem importância econômica devido a extração de óleos essenciais e resinas extraídas de várias partes da planta dessa família e são utilizadas na medicina popular, cerimônia religiosa e na fabricação cosméticos [Palermo 2018, Meralia 2018].

Protium heptaphyllum (Burseraceae) é uma espécie arbórea perene muito difundida no Brasil e na América do Sul. É popularmente conhecida como Almécega, Breu-branco, Breu verdadeiro, Mastique, Almiscar selvagem, entre outros nomes. Esta espécie também é conhecida por sua importância comercial, sendo utilizada na fabricação de incensos, essências, cosméticos e drogas. Na medicina popular esta espécie é considerada uma importante agente terapêutica, sendo usada como anti-inflamatório, analgésico, expectorante e na cura de feridas. Esses fatos têm atraído a atenção de muitos

pesquisadores para vários membros dessa família nos últimos anos [Pontes 2007, Palermo 2017, Sincurá 2017].

Em um trabalho realizado por Mobin *et al.* [Mobin 2018], objetivando confirmar a atividade cardiovascular do óleo essencial extraído da resina da espécie *protium heptaphyllum*, realizaram aplicações de 10 µmol/L do óleo essencial em anéis da artéria mesentérica de ratos. Os testes demonstraram que o efeito vasorelaxante do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* foi semelhante ao bloqueador do canal de Ca^{2+} verapamil, embora não apresentando a mesma potência farmacológica. Os resultados proporcionaram expectativa de uma alternativa terapêutica para indivíduos com hipertensão, no entanto, os autores afirmam que mais estudos são necessários para investigar o mecanismo vasorelaxante do óleo essencial da resina desta espécie [Mobin 2018].

Estevam *et al.* [Estevam 2018], investigaram o efeito parasitário do óleo essencial das folhas de *Protium ovatum* sobre *Trypanosoma cruzi amazonensis*. Segundo os autores, o óleo essencial das folhas de *Protium ovatum* demonstraram expressiva atividade tripanocida sobre as formas tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* na concentração de CL_{50} 28,55 µg/L, sendo que o controle positivo (benznidazol) apresentou CL_{50} de 9,8 µg/L [39]. Portando, esse é um resultado satisfatório, já que a literatura descreve que amostras com relação as suas atividades tripanocidas como: fortemente ativas (CL_{50} < 10 µg/mL); ativas (CL_{50} >10 < 50 µg/mL); moderadamente ativas (CL_{50} > 50 < 100 µg/mL) e inativo CL_{50} > 100 µg/mL [Estevam 2016].

Pontes *et al.*[Pontes 2007] testaram o efeito repelente e a toxidade do óleo essencial das folhas e dos frutos da espécie *Protium heptaphyllum* contra o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), que é uma praga que se alimenta de vários tipos de lavoura. Após seus experimentos foi constatado que aplicações de 25 µl do óleo essencial das folhas e dos frutos desta espécie apresentava atividade fumigante, reduzindo a oviposição dos ácaros. O óleo essencial dos frutos além de apresentar atividade fumigante, apresentou uma taxa de mortalidade correspondendo a 63%, na concentração de 10 µL/L de ar após 72

horas. Os autores sugerem que a atividade acaricida dos óleos essenciais dessa espécie é uma maneira promissora de controle de pragas em ambientes fechados. Sendo necessário mais estudos para avaliar a relação custo benefício do uso desses óleos em grandes escalas para proteção de espécies cultivadas em estufas[Pontes 2007].

Sincurá *et al*.[Sincurá 2017], com o intuito de avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *Protium heptaphyllum* em *Lutzomyia longipalpis* (mosquito palha), um vetor comprovado da doença leishmaniose visceral. Após 2 horas de exposição ao extrato, a taxa de mortalidade de *Lutzomyia longipalpis* foi de 52% na concentração de 0,1 mg/mL assemelhando-se ao controle positivo (cipermetrina). Após 72 horas de exposição ao extrato, as taxas de mortalidade foram de 81% e 83% nas concentrações de 0,1 e 0,25mg/mL, respectivamente [Sincurá].

Nessa breve revisão podemos perceber que os integrantes da família Burseraceae são uma grande fonte de compostos com potencial biológico em. No entanto, é importante o prosseguimento dos estudos para que possamos dar contribuição química para a família Burseraceae afim de proporcionar descobertas de novos compostos com potencial biológico e terapêutico, assim como, entender o mecanismo de ação de tais compostos, se o responsável é um único composto ou se é por ação sinérgica [Krinski].

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Investigar a composição química dos compostos voláteis obtidos por hidrodestilação das espécies *Annona montana*, *Xylopia frutescens* e *Protium heptaphyllum* coletadas na floresta Nacional do Ibura.

2.2 Específicos

- Extrair por hidrodestilação os voláteis das folhas secas das espécies *Annona montana*, *Xylopia frutescens* e *Protium heptaphyllum.*
- Identificar os componentes químicos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas das espécies estudadas.
- Isolar e caracterizar os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais.
- Submeter os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação a testes citotóxicos.
- Submeter os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação a testes contra as larvas do mosquito *Aedes aegypi.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As espécies estudadas foram identificadas sob a coordenação do professor Dr. Adauto de Souza Ribeiro (DBI/UFS), juntamente com seu aluno de iniciação científica José Paulo de Santana, a qual foram coletas no turno da manhã entre 08 de novembro de 2016 a 20 de março de 2018 na floresta Nacional do Ibura, situada no município de Nossa Senhora do Socorro-SE. As espécies coletadas para este estudo foram referenciadas através do sistema de posicionamento global (GPS), e suas exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Sergipe, as quais estão listadas na tabela 1.

Tabela 1: Localização geográfica e número do herbário.

Espécie	Latitude	Longitude	Nº. herbário	Família
Annona montana	10°50'42.5"S	37°08'30.5"W	27642	Annonaceae
Protium heptaphyllum	10°50'37.3"S	37°08'30.8"W	30727	Burseraceae
Xylopia frutescens	10°50'37.3"S	37°08'29.8"W	-	Annonaceae

3.2 Processo de secagem e moagem das folhas

As folhas das três espécies estudadas foram secas em estufa de circulação de ar modelo MA 0351336 da MARCONI, em uma temperatura de 40ºC por 96 horas. Após a secagem, as folhas foram trituradas utilizando um liquidificador industrial (Colombo Premium 10L).

3.3 Procedimento para obtenção do óleo essencial das amostras

O óleo essencial foi obtido utilizando a técnica de hidrodestilação através da aparelhagem do tipo Clevenger. Duzentos gramas do material vegetal foram misturados com 1,5L de água destilada e colocado em um balão de 2L e aquecido em manta por 180 minutos. O óleo foi tratado com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção completa de água. Os óleos essenciais obtidos foram transferidos para frascos de vidros âmbar secos e armazenado em freezer para análises posteriores. As extrações foram realizadas em triplicata.

3.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

As análises dos óleos extraídos foram realizadas utilizando um Cromatografo Gasoso- Espectrometria de Massas CG-EM/CG-DIC (GC-2010 Plus; GC/MS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas usando uma coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (polissiloxano 5 %-difenil-95 %-dimetil) de 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.), 0,25-m de espessura de filme, em um fluxo constante de hélio (99,999 %) com taxa de 1,2 $mL.min^{-1}$. Foi utilizado um volume de injeção de 1 uL (10 $mg.mL^{-1}$), com uma razão de split de 1:30. A programação de temperatura do forno utilizada foi a partir de 50° C (isoterma durante 4 min), com um aumento de 4° C / min, à 200° C, em seguida, a 10° C / min até 300° C, terminando com uma isoterma de 5 min a 300° C.

3.5 Identificação dos constituintes

A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada por CG/EM, enquanto o percentual dos constituintes individuais foi determinado por CG/DIC, onde o teor de cada componente foi determinado com base na área de cada pico relacionada com a área total dos picos no cromatograma. Cada componente do óleo foi identificado com base no tempo de retenção utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) [Van Den Dool], considerando-se uma série homóloga de n-alcanos C8-C18, índice de retenção, corrigido por regressão linear, bem como por comparação do padrão de fragmentação próprio de cada componente, com espectros de massa de banco de dados virtual (Biblioteca NIST107, NIST21 e Willey 8) e, ainda, por comparação visual com espectros de massa registrados na literatura [Adams].

3.6 Ensaios biológicos

3.6.1 Ensaios larvicida sobre *Aedes aegypti*

Os ensaios larvicidas sobre o *Aedes aegypti* foram realizados na Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação e parceria da Prof[a]. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

Diferentes concentrações das amostras foram dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e transferida para um béquer de 50 mL. Em seguida, foram adicionadas 50 larvas de terceiro estágio juntamente com 19,7 mL de água [Lima **2011**]. Simultaneamente, foram feitos teste em branco, utilizando água e DMSO a 1,5%. Ao término de 24 horas foi realizada a contagem das larvas exterminadas e calculada a CL_{50} [Oliveira **2002**, Santos **2006**].

Ensaios de Citotoxicidade *IN VITRO*

Os testes citotóxicos foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Gardênia Carmem Gadelha Militão, com linhagens celulares NCI-H292 (câncer de pulmão), MCF-7 (câncer de mama) e HCT 116 (câncer colorretal) na Universidade Federal de Pernanbuco. As linhagens tumorais humanas utilizadas foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2. Essa análise faz parte de um screening inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de screening do National Cancer Institute dos 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), [Mosman **1983**], tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil de tetrazolium (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]. O quimioterápico doxorrubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo.

As linhagens NCI-H292 (câncer de pulmão), HCT 116 (Câncer de Cólon), MCF-7 (câncer de mama) foram plaqueadas na concentração de 1 x 10^5 células/mL. A substância previamente dissolvida em DMSO foi diluída em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após

dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 575nm.

3.7 Caracterização química dos óleos essenciais de *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens*

Após a obtenção dos óleos essenciais foram medidos o volume e o teor, calculado através da equação 1 [Santos **2004**]:

$TO = \frac{Vo}{Bm}\ x\ 100,$ onde;

(1)

TO= teor de óleo essencial em porcentagem

Vo= volume do óleo essencial lido diretamente na escala do tubo separador.

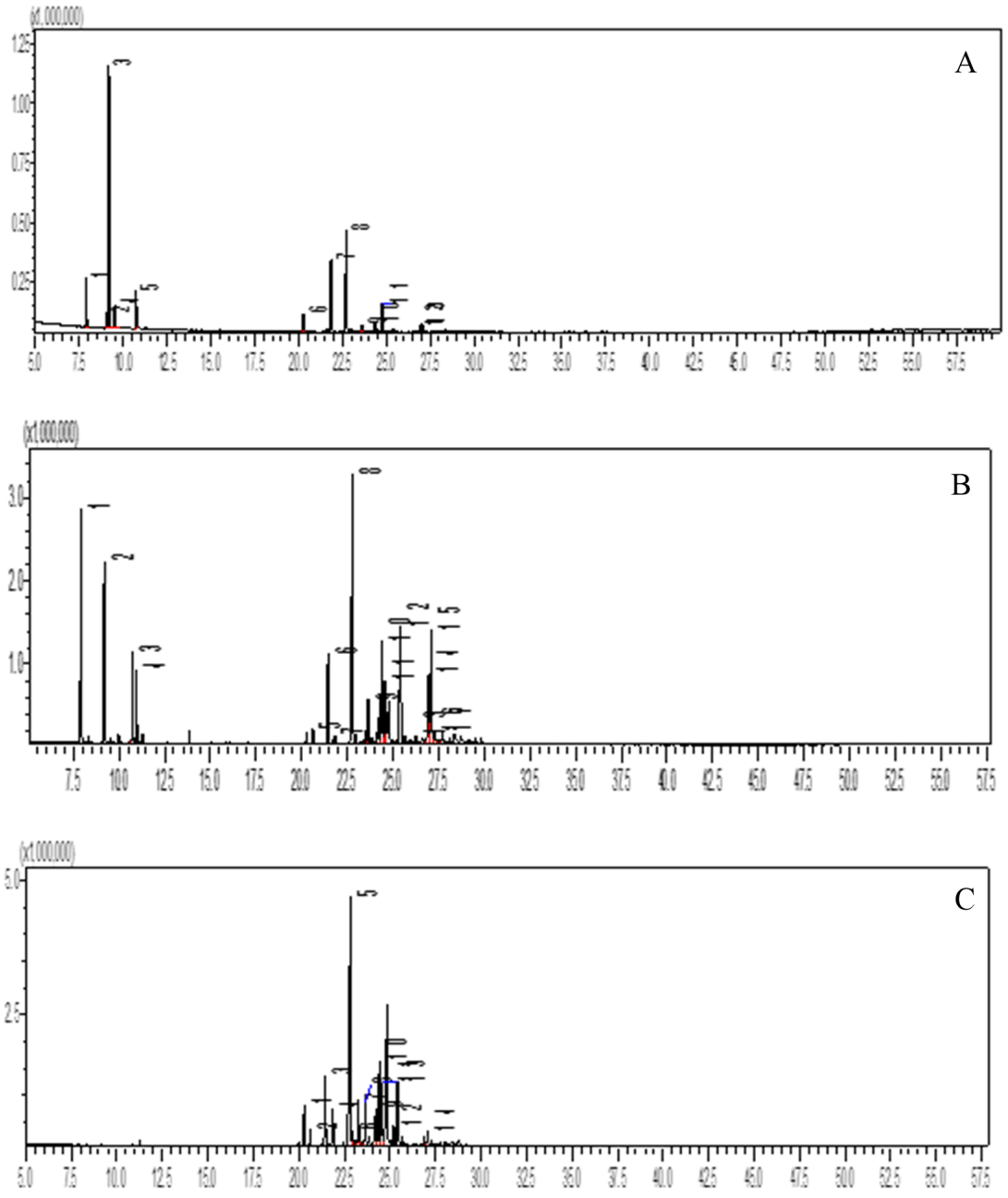
Bm= biomassa vegetal.

100= fator de conversão para porcentagem.

Nas condições desse estudo o teor de óleo essencial das folhas secas de *Annona montana* e *Protium heptaphyllum* obtidos por hidrodestilação foi de 0,05%. Enquanto que para a *Xylopia frutescens* foi observado um teor de (0,7%), na literatura podemos encontrar teores semelhantes para o óleo essencial de *Xylopia frutescens*, por exemplo, Ferraz *et al.* [Ferraz **2013**], realizaram extrações do óleo essencial desta espécie e obtiveram teor em torno de 1,0% e Silva *et al.*[**Silva 2013**] encontraram cerca de 1.1%.

Na figura 14 pode-se observar os cromatogramas dos óleos essenciais obtidos das folhas secas das espécies *Annona montana*, *Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens*.

Figura 14 – Cromatograma do óleo essencial de *Annona montana* (A), *Protium heptaphyllum* (B) e *Xylopia frutescens* (C).



Os dados da composição química dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das espécies *Annona montana*, *Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens* podem ser observados na tabela 2, 3 e 4. Feito as análises foram detectados 13 compostos para o óleo essencial da *Annona montana*, 18 compostos para o óleo essencial da *Protium heptaphyllum* e 15 compostos para o óleo essencial de *Xylopia frutescens.*

Tabela 2: Constituintes químicos do óleo essencial obtido por hidrodestilação da *Annona montana.*

Pico	TR (min)	Composto	%CG-EM	%CG-DIC	IRR exp.*	IRR lit.**
1	7,900	α-pineno	6,19	6,29	936	932
2	9,045	sabineno	2,00	1,84	976	969
3	9,175	β-pineno	36,00	37,69	981	974
4	9,505	mirceno	3,39	2,80	992	988
5	10,730	limoneno	5,94	5,96	1032	1024
6	20,260	δ-elemeno	3,20	3,43	1343	1335
7	21,830	β-elemeno	12,77	12,68	1395	1389
8	22,695	(E)-cariofileno	17,79	17,55	1416	1417
9	23,610	α-humuleno	1,34	1,10	1458	1452
10	24,335	germacreno D	1,83	1,73	1492	1484
11	24,750	biciclogermacreno	5,94	6,16	1508	1500
12	26,870	espatulenol	1,39	0,83	1577	1577
13	27,045	óxido de cariofileno	2,22	1,94	1583	1582
Monoterpenos não oxigenados				54,58		
Sesquiterpenos não oxigenados				42,65		
Sesquiterpenos oxigenados				2,77		
Total de compostos identificados				100		

*, Índice de retenção relativo experimental; **, índice de retenção relativo da literatura; TR, tempo de retenção em minutos.

Tabela 3: Constituintes químicos do óleo essencial obtido por hidrodestilação da *Protium heptaphyllum*

Pico	TR (min)	Composto	%CG-EM	%CG-DIC	IRR exp.*	IRR lit.**
1	7,940	α-pineno	12,41	16,03	937	932
2	9,195	β-pineno	9,31	11,03	981	974
3	10,750	limoneno	4,45	4,76	1033	1024
4	10,970	(Z)-β-ocimeno	3,36	4,15	1040	1032
5	20,620	α-cubebeno	0,77	0,66	1355	1345
6	21,450	α-yalangeno	5,08	5,00	1382	1373
7	21,825	β-elemeno	0,75	0,63	1395	1389
8	22,790	(E)-cariofileno	20,78	21,72	1420	1417
9	23,640	α-humuleno	2,54	2,57	1459	1452
10	24,390	γ-amorfeno	6,72	5,87	1494	1495
11	24,545	β-*trans*-guaino	3,57	3,70	1501	1502
12	25,390	7-epi-α-selineno	10,14	8,97	1529	1520
13	26,265	(E)-nerolidol	0,84	0,45	1557	1561
14	26,960	espatulenol	5,52	4,60	1580	1577
15	27,115	óxido de cariofileno	7,86	5,98	1587	1582
16	27,300	salvial-4(14)-en-1-ona	1,03	0,40	1596	1594
17	27,710	epóxido de humuleno II	1,07	0,43	1616	1608
Monoterpenos não oxigenados				35,97		
Sesquiterpenos não oxigenados				49,12		
Sesquiterpenos oxigenados				11,46		
Total de compostos identificados				96,55		

*, Índice de retenção relativo experimental; **, índice de retenção relativo da literatura; TR, tempo de retenção em minutos.

Tabela 4: Constituintes químicos do óleo essencial obtido por hidrodestilação da *Xylopia frutescens*

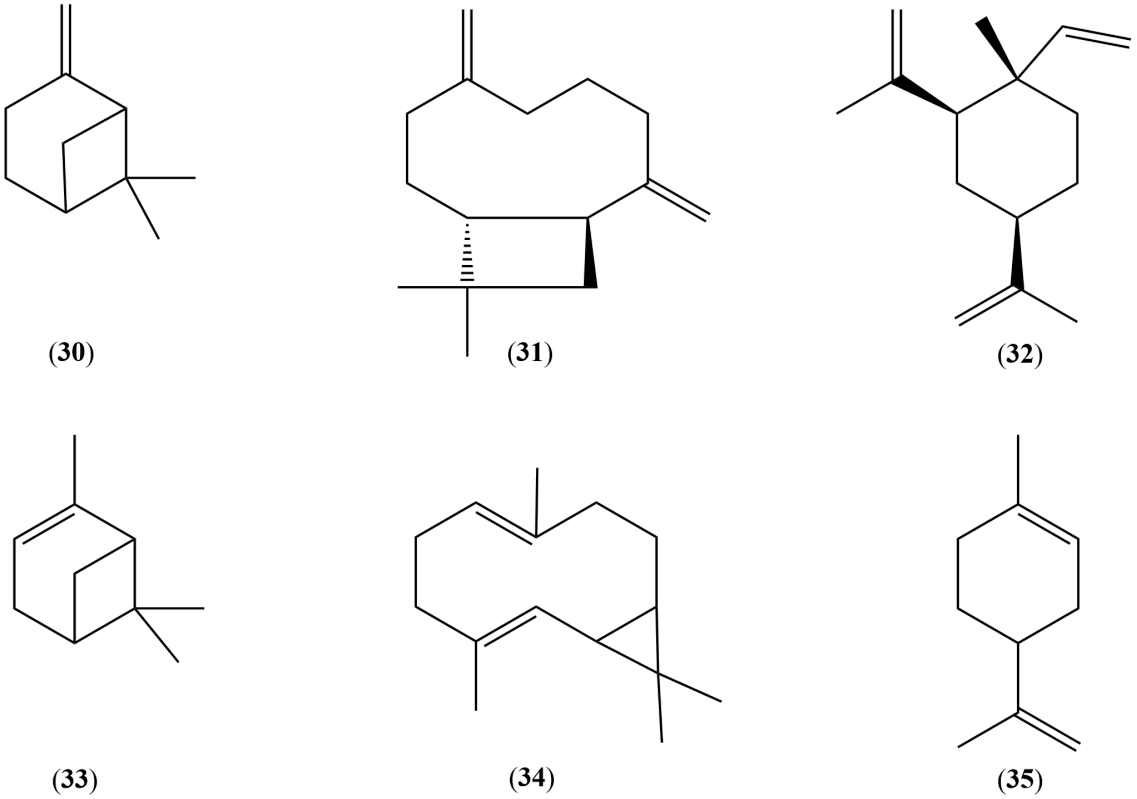
Pico	TR (min)	Composto	%CG-EM	%CG-DIC	IRR exp.*	IRR lit.**
1	20,285	δ-elemeno	3,05	4,01	1344	1335
2	20,625	α-cubebeno	1,11	1,27	1355	1345
3	21,455	α-copaeno	5,43	6,21	1383	1374
4	21,855	β-elemeno	3,02	3,79	1396	1389
5	22,840	(E)-cariofileno	34,55	34,53	1422	1417
6	22,960	β-copaeno	1,26	0,55	1428	1430
7	23,265	aromadrendeno	3,53	3,80	1442	1439
8	23,650	α-humuleno	3,37	3,26	1460	1452
9	24,225	γ-muuroleno	4,71	4,38	1487	1478
10	24,410	*trans*-muurola-4(14),5 dieno	7,91	7,48	1495	1493
11	24,565	*trans*-β-guaieno	5,33	5,08	1502	1503
12	25,200	γ-cadineno	1,73	1,63	1523	1513
13	25,415	δ-cadineno	5,76	5,67	1530	1522
14	27,065	óxido de cariofileno	1,40	0,80	1584	1582
Sesquiterpenos não oxigenados				81,66		
Sesquiterpenos oxigenados				0,80		
Total de compostos identificados				82,46		

*, Índice de retenção relativo experimental; **, índice de retenção relativo da literatura; TR, tempo de retenção em minutos.

Análise do óleo essencial de *Annona montana*

A análise do óleo essencial da espécie *Annona montana* demonstrou que sua composição consistia principalmente de monoterpenos não oxigenados com percentual de 54,58%, sesquiterpenos não oxigenados com 42,65% e sesquiterpenos oxigenados com percentual de 2,77%. Foram detectados 13 compostos nos óleos essenciais desta espécie com o total de 100% de identificação de seus constituintes. Os compostos, β-pineno 37,69%(**30**), E-cariofileno 17,55% (**31**), β-elemeno 12,68 % (**32**), α-pineno 6,29% (**33**), biciclogermacreno 6,16% (**34**) e o limoneno 5,96% (**35**), foram os principais componentes.

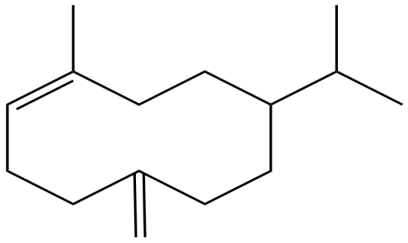
Figura 15 - Estrutura dos compostos majoritário do óleo essencial de *Annona montana.*



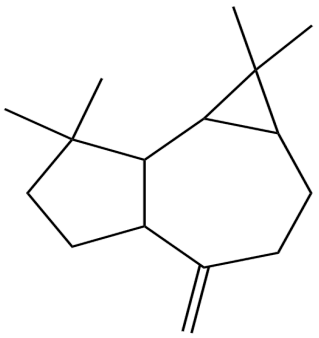
O espatulenol e o óxido de cariofileno já foram descritos em vários estudos baseados em extratos e óleos essenciais de várias espécies do gênero *Annona*, podendo ser considerados marcadores químicos desse gênero [Formagio 2013, Araujo 2014, Costa 2012, Dutra 2014.

Xavier *et al* [Xavier **2016**], identificaram do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae), os compostos: β-elemeno 2,21% (**32**), germacreno D 7,56% (**36**), espatulenol 18,60% (**37**) e o óxido de cariofileno 1,14% (**38**). Pino *et al.* [Pino **2002**], em estudo sobre os componentes voláteis do óleo essencial dos frutos de graviola silvestre (*Annona montana*), identificaram os compostos: α-pineno 0,3% (**33**), β-pineno 0,10% (**30**), e o mirceno 0,20% (**39**). Estudos como esse demonstram a similaridade química presente nos óleos essenciais dos membros da família Annonaceae. No trabalho desenvolvido por Chavam *et al*. [Chavam **2010**], isolaram do extrato da casca de *Annona esquamosa* o óxido de cariofileno (**38**) com intuito de constatar seu efeito analgésico e anti-inflamatório em ratos. No óleo essencial de *Annona montana* identificamos o composto óxido de cariofileno 1,94% (**38**), no entanto, seu isolamento para fins de verificar suas atividades analgésicas e anti-inflamatórias não são viáveis devido a sua baixa percentagem.

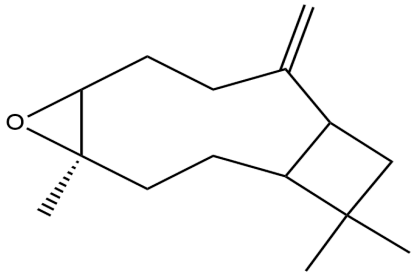
Figura 16 - Estrutura de compostos identificados no óleo essencial de algumas espécies da família Annonaceae.



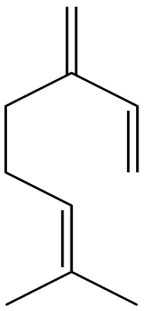
(**36**)



(**37**)



(**38**)

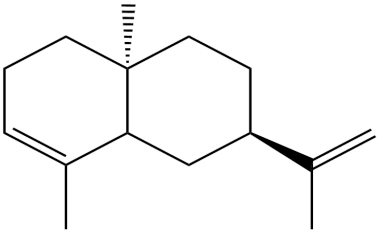


(**39**)

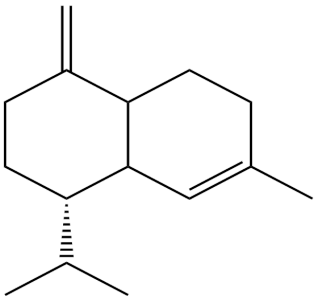
Análise do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*

Foram detectados 18 compostos do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*, com a identificação de 17 compostos, representando 96,55% do percentual total, sendo constituído quimicamente por monoterpenos não oxigenados (35,97%), sesquiterpenos não oxigenados (49,12%) e por sesquiterpenos oxigenados (11,46%). Os compostos (E)-cariofileno 21,78% (**31**), α-pineno 16,03% (**33**), β−pineno 11,03% (**30**), 7-epi-α-selineno 8,97% (**40**), óxido de cariofileno 5,98% (**38**), y-amorfeno 5,87% (**41**), limoneno 4,76% (**35**) e o espatulenol 4,60% (**37**), foram os constituintes majoritários.

Figura 17: Estrutura dos compostos majoritários identificados no óleo essencial de *Protium heptaphyllum*.



(**40**)



(**41**)

Os sesquiterpenos oxigenados espatulenol (**37**) e óxido de cariofileno (**38**), foram previamente identificados como constituintes majoritários no óleo essencial das partes aéreas de *Protium nitidifolium*, com teores de 22,35% e 15,31 respectivamente, na análise do óleo essencial de *Protium subserratum*, o espatulenol (**37**), foi identificado como um dos compostos majoritários apresentando o teor de 10,89 % [Oliveira **2018**].

Ao relatar alguns estudos presentes na literatura aludindo a mesma espécie, podemos observar algumas similaridades entre teores e compostos encontrados nos óleos essenciais, mesmo variando o local de coleta e outros fatores que podem ocasionar mudanças em sua constituição. Em estudo realizado no estado de Pernambuco por Pontes *et al*. [Pontes 2007], extraíram o óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum* obtendo o teor de 0,70%. A investigação química do óleo essencial revelou que 84,4% de seus constituintes eram sesquiterpenos. Entre os compostos identificados (limoneno 0,80% (**35**), β-elemeno 0,10% (**32**) e (E)-nerolidol 2,00% (**42**)) detectamos no presente estudo.

Na região norte do Brasil, no estado do Amazonas, Zoghbi *et al.* [Zoghbi 1995], como resultado de seus trabalhos a partir óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum,* obtiveram o teor de 0,15%. Os compostos identificados foram o α-pineno 0,90% (**33**), limoneno 1,27% (**35**), α-cubebeno 0,17% (**43**), β-elemeno 22,09% (**32**), β-cariofileno 11,11% (**31**) e o α-humuleno 7,19% (**44**).

Bandeira *et al.*[Bandeira 2001], durante seus experimentos, extraíram o óleo essencial de amostras de *Protium Heptaphyllum* coletadas no município de Crato-Ceará e obtiveram o teor de 0,30%. Em consonância com o presente estudo, os autores identificaram o α-pineno 1,60% (**33**), β-pineno 1,00% (**30**), (E)-cariofileno 18,60% (**31**), α-humuleno 8,00% (**44**), espatulenol 4,40% (**37**), óxido de cariofileno 4,70% (**38**) e o epóxido de humuleno 1,00% (**45**).

Em trabalhos realizados por Citó *et al.* [Citó 2006] no estado do Piauí, através da extração do óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum*, foi possível identificar o β-cariofileno 32,08% (**31**) e o α-humuleno 2,30% (**44**). Apresentando um teor de 0,50%. Amostras desta mesma espécie originárias da cidade de Valença na Bahia, possibilitou a Araújo *et al.* [Araujo 2011] identificar do óleo essencial o α-pineno 40,32% (**33**), β-pineno 4,78% (**30**). Esses dados supracitados podem ser observados na tabela 5.

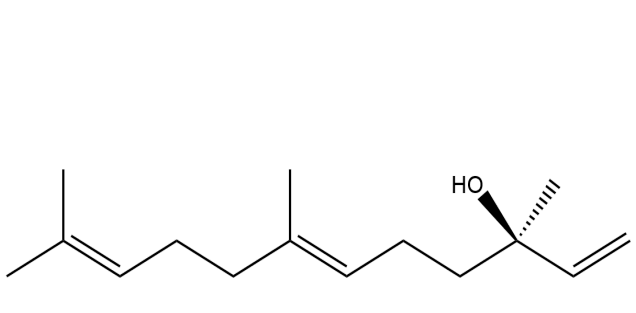
É evidente que a quantidade e variação da composição do óleo essencial nas plantas é fortemente influenciado por fatores climáticos e parâmetros geográficos, bem como fatores genéticos [Siani 2004, Machado 2003].

Tabela 5 – Compostos mais comuns em estudos com óleos essenciais da espécie *Protium heptaphyllum*, em porcentagem.

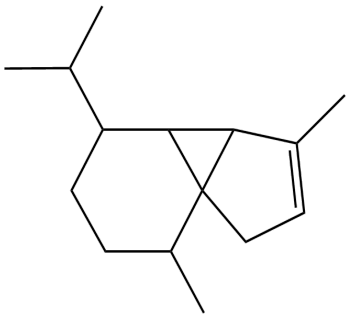
Composto	**Pontes *et al.* 2007**	**Zoghbi *et al.* 1995**	**Bandeira *et al.* 2001**	**Araujo *et al.* 2011**	**Citó *et al.* 2006**

α-pineno		0,99	1,16	40,32	
β-pineno			1,00	4,78	
limoneno	0,80	1,27			
β-elemeno	0,10	22,09			
α-cubebeno		0,17			
(E)-cariofileno		11,11	18,60		32,08
(E)-nerolidol	2,00				
α-humuleno		7,19	8,0		2,30
espatulenol			4,4		
óxido de cariofileno			4,7		
epóxido de humuleno II			1,00		

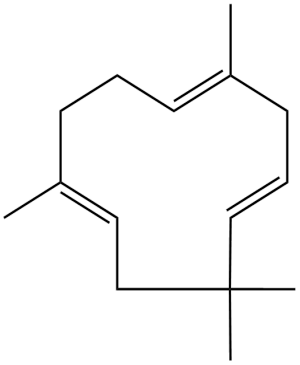
Figura 18 - Estrutura química de compostos identificado em óleos essenciais de *Protium heptaphyllum.*



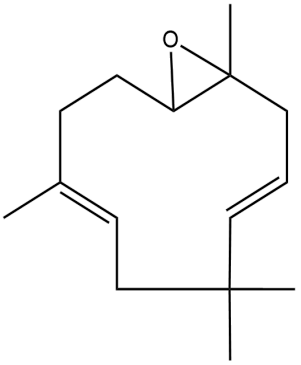
(**42**)



(**43**)



(**44**)

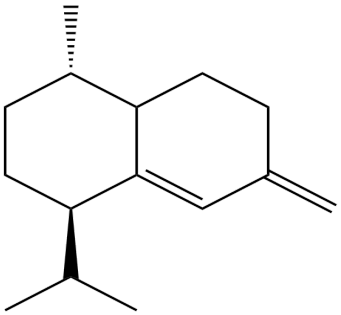


(**45**)

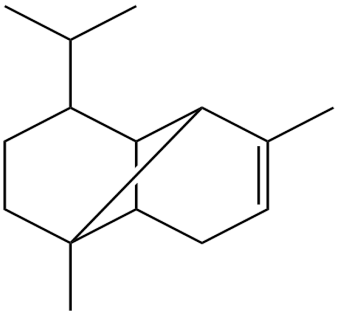
Análise do óleo essencial de Xylopia frutescens

Foram detectados 15 compostos na análise do óleo essencial de *Xylopia frutescens*, sendo 14 identificados representando 82,46%, originando uma composição química de praticamente sesquiterpenos não oxigenados (81,66%) e apenas um sesquiterpeno oxigenado, o óxido de cariofileno 0,80%. Seus principais constituintes do óleo essencial de *Xylopia frutescens* foram: (E)-cariofileno 34,53% (**31**), *trans*-muurola-4(14),5-dieno 7,48% (**46**), α-copaeno 6,21% (**47**), δ-cadineno 5,67% (**48**) e o *trans*-β-guaieno 5,08% (**49**).

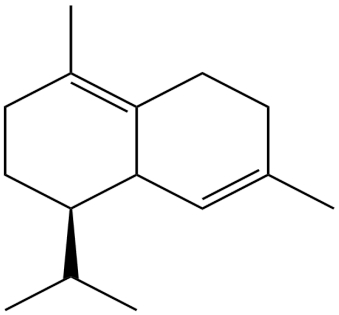
Figura 19 - Estrutura dos compostos majoritários do óleo essencial de *Xylopia frutescens.*



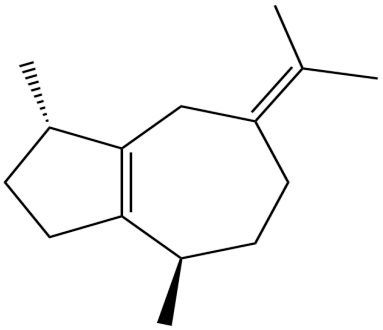
(**46**)



(**47**)



(**48**)



(**49**)

Estudos fitoquímicos tem relatado a presença de alguns dos compostos majoritários em outros óleos essenciais obtidos de regiões diferentes desta mesma espécie.

Analisando a composição química da espécie *Xylopia frutescens*, Ferraz *et al.*[Ferraz **2013**], observou que os compostos (E)-cariofileno 31,48% (**31**), biciclogermacreno 15,13% (**34**), germacreno D 9,66% (**36**), δ-cadineno 5,44% (**48**), viridifloreno 5,09% (**50**) e o a-copaeno 4,35% (**47**) foram os principais constituintes no óleo essencial desta espécie. Nesse estudo obtiveram o teor de 1,00% na extração do óleo essencial. Durante os estudos desenvolvidos por Nascimento *et al.*[Nascimento 2017], os compostos α-cubebeno 1,01% (**43**),

α-copaeno 4,98% (**47**), β−elemeno 6,35 % (**32**), (E)-cariofileno 17,24% (**31**), α-humuleno 1,67% (**44**) e o γ-muuroleno 2,17% (**51**), foram relatados como componentes do óleo essencial de *Xylopia frutescens*.

Apesar da concordância entre a composição química do óleo essencial de *Xylopia frutescens* de regiões diferentes, estudos recentes demonstram variações significativas no óleo essencial de várias espécies pertencentes ao gênero *Xylopia*. Alguns desses estudos serão infracitados a seguir.

Maia *et al.*[Maia **2005**], basearam seus estudos na identificação dos compostos voláteis de 4 espécies do gênero *Xylopia* (*aromática, cayannenis, emarginata* e *nítida*). Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *X. aromática* foram biciclogermacreno 36,50% (**34**), espatulenol 20,50% (**37**) e o limoneno 4,60% (**35**). Os principais compostos do óleo essencial de *Xylopia cayannensis* foi o α-pineno 29,20% (**33**), β-pineno 16,50% (**30**), óxido de cariofileno 14,50% (**38**), germacreno D 4,70% (**36**) e o 1,8-cineol 4,50% (**52**). Os principais componentes encontrados no óleo essencial de *X. emarginata* foi o espatulenol 73,00% (**37**) e o epóxido de humuleno II 3,40% (**45**). Os principais constituintes encontrados no óleo essencial de *X. nítida* foi γ-terpineno 44,10% (**53**), *p*-cimeno 13,70% (**55**), α-terpineno 12,60% (**54**) e o limoneno 11,30% (**35**).

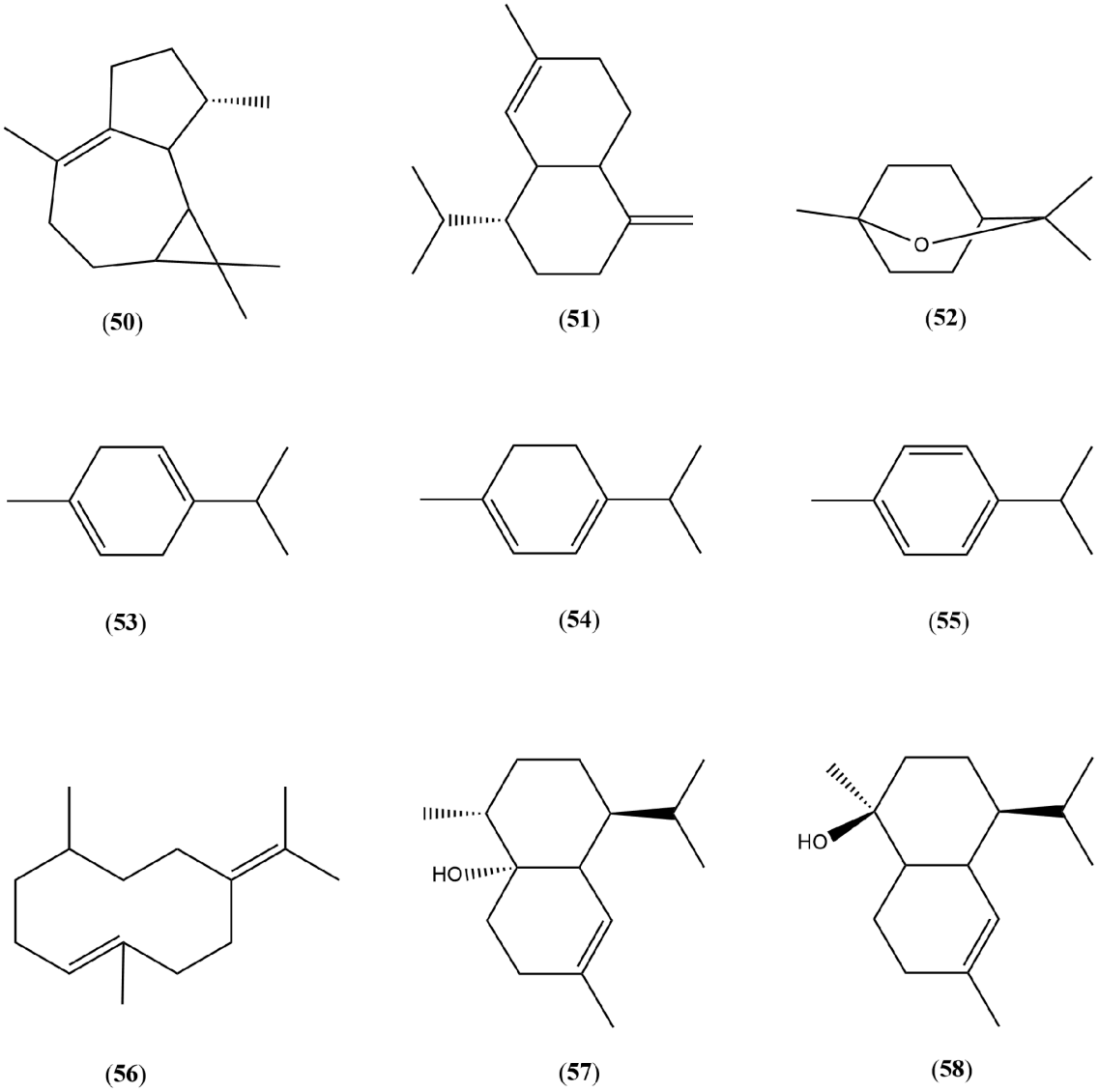
Em um outro estudo envolvendo a espécie *X. aromática* desenvolvido por Lago *et al.*[Lago **2003**], identificaram como componentes majoritários o α-pineno 26,10% (**33**), limoneno 22,3% (**35**) e o biciclogermacreno 20,4% (**34**). No óleo essencial de *X. sericea* os principais compostos encontrados foram o cubenol 57,40% (**57**) e o epi-α-muurolol 26,10% (**58**) [Pontes$_1$ **2007**]. Em estudo para determinação dos constituintes químicos do óleo essencial de *X. langsdorffiana*, Tavares *et al.*[Tavares **2007**] observaram que os principais

compostos eram o germacreno D 22,90% (**36**), *trans*-b-guaieno 22,60% (**49**), (E)-cariofileno 15,70% (**31**) e o a-pineno 7,3% (**33**).

Quintan *et al.*[Quintan **2013**], estudaram a composição química da espécie *Xylopia laevigata* coletadas em três locais diferentes no estado de Sergipe. A análise dos constituintes majoritários demonstrou uma variação dos teores entre os mesmos compostos identificados nas três amostras, sendo eles: γ-muuroleno 0,60-7,99% (**51**), δ-cadineno 1,15-13,45% (**48**), germacreno B 3,22-7,31% (**56**), α-copaeno 3,33-5,98% (**47**), germacreno D 9,09-60-44% (**36**), biciclogermacreno 7,00-14,63% (**34**) e o (E)-cariofileno 5,43-7,98% (**31**). Esses compostos foram os maiores constituintes em todas as amostras.

Conquanto alguns compostos químicos presentes nos óleos essenciais de *Xylopia frutescens* foram encontrados nos óleos essenciais de outras espécies do gênero *Xylopia*, muitos estudos, como os supracitados, demostraram flutuações significativas na composição dos óleos essenciais de várias espécies pertencentes a este gênero[Ferraz 2013]. Deste modo faz-se necessário a continuidade dos estudos mapeando a composição química das espécies que compõem o gênero *Xylopia*, que são ricas em monoterpenos e sesquiterpenos.

Figura 20 – Estrutura química de compostos relatados em óleos essenciais do gênero *Xylopia*.



(**50**) (**51**) (**52**)

(**53**) (**54**) (**55**)

(**56**) (**57**) (**58**)

Atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*

Os óleos essenciais de *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens* foram submetidos a ensaios como agentes de mortalidade das larvas. Os ensaios de atividade larvicida foram realizados com larvas do mosquito *Aedes aegypti* no terceiro estágio, posteriormente foi verificado a mortalidade das larvas em um período de 24 horas. O tratamento dos dados obtidos com a quantidade de larvas mortas foi realizado com base na Concentração Letal 50% (CL_{50}), que se trata da concentração na qual o número de larvas vivas é igual ao número de larvas mortas. As análises foram realizadas em triplicata.

A OMS 2005 [OMS 2005] estabelece diretrizes para a realização de teste larvicidas de mosquitos, todavia, não designa os parâmetros que devem ser usados no reconhecimento de atividade larvicida. Por conseguinte, inúmeros autores criaram diferentes formas para classificar os produtos testados [Cheng 2003, Kiran 2006].

Neste trabalho seguiu-se a classificação de Komalamisra *et al.* 2005 [Komalamisra **2005**] como critério de avaliação do potencial dos óleos essenciais testados. Os autores consideram amostras de óleos essenciais com CL_{50} < 50 µg/mL ativas, CL_{50} entre 50 a 100 µg/mL são moderadamente ativas, CL_{50} entre 101 a 750 µg/mL são eficazes e CL_{50} acima de 750µg/mL são inativas.

Das amostras testadas, o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* foi a que apresentou maior atividade larvicida, obtendo uma CL_{50} com 112,878 ± 0,730 µg/mL, posteriormente o óleo essencial de *Xylopia frutescens* apresentou uma CL_{50} de 143,606 ± 0,894 µg/mL. O óleo essencial de *Annona montana* não apresentou atividade larvicida.

Um resultado mais próximo foi relatado por Santana *et al.* [Santana **2009**], em trabalho com óleo essencial da casca do caule de *Protium confusum* frente as larvas do *Aedes aegypti*, o qual apresentou uma CL_{100} de 125 µg/mL,

demostrando ação larvicida para espécies do gênero *Protium,* embora as partes da planta e a composição química tenham sido diferentes.

No tocante do óleo essencial de *Xylopia frutescens*, Nascimento *et al.*[Nascimento **2017**], em seus estudos com o óleo essencial de *Xylopia frutescens*, constatou a falta de atividade contra o *Aedes aegypti*, sendo tóxico apenas em concentrações acima de 1000 µg/mL. Essas discrepâncias dos resultados entre estudos realizados sobre amostras da mesma espécie podem ser explicadas devido a constituição química diferente, que é evidentemente influenciada por fatores abióticos.

Para entender melhor a relação entre óleo essencial e sua atividade larvicida, foram testados isoladamente o α e β-pineno (adquiridos comercialmente), dois dos principais componentes identificados nos óleos essenciais do presente estudo. Os monoterpenos α e β-pineno apresentaram atividade larvicida, com uma CL_{50} de 143,032 ± 2,067 µg/mL e 52,026 ± 0,939 µg/mL, respectivamente.

Em estudo realizado por Simas *et al.* [Simas **2004**], sugere que algumas características estruturais foram importantes para a atividade larvicida, a ligação dupla exocíclica no β-pineno (CL_{50} = 52,026) parece ser mais importante que a ligação dupla endocíclica no α-pineno (CL_{50} = 143,032). Há vários relatos na literatura que atribuem atividades citotóxica, larvicida, antiparasitária, bactericida dentre outras ao α e β-pineno [Sobral-Souza **2014**, Campos **2014,** Silva **2010**].

Atividade Citotóxica *IN VITRO*

A tabela 6 apresenta os resultados da triagem citotóxica das amostras testadas. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança no programa *GraphPad Prism*. A

Concentração inibitória em 50% (CI_{50}) foi calculada por regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

Tabela 6 - Efeito Citotóxico em linhagens de células tumorais. Concentração inibitória em 50% (CI_{50}) das amostras em três linhagens tumorais e seu intervalo de confiança em µg/mL.

Amostra	CI_{50} MCF-7	Intervalo de confiança p/ MCF-7	CI_{50} NCI-H292	Intervalo de confiança p/ NCI-H292	CI_{50} HCT 116	Intervalo de confiança p/ HCT-116
P. hepataphyllum	44,25	(29.87 - 65.5)	62,38	49.53-78.57	18,63	11,09-31,3
A. montana	>80		>80		>80	
X. frutescens	58,79	44,2-78,3	41,19	36,6-46,31	-	-
DOX	0,3	0,2-0,4	1,15	0,87-1,55	0,4	0,2-0,6

O óleo essencial de *Annona montana* apresentou uma CI_{50} > 80 µg/mL, demostrando que o óleo essencial não foi eficaz contra as três linhagens de células tumorais testadas. Silva *et al.*[Silva **2015**], durante seus trabalhos com extratos etanólicos das folhas e da casca do caule de *Annona muricata,*

constataram a atividade citotóxica desses extratos contra as linhagens celulares SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60. Almeida *et al.*[Almeida **2014**], em suas pesquisas examinou os efeitos biológicos do extrato etanólico, hexânico e clorofórmico da *Annona vepretorum,* validando a atividade citotóxica para as linhas celulares OVCAR-8, SF-295 e HCT-116. Quitans *et al.*[Quitans **2013**], testou a citotoxicidade do óleo essencial de *Xylopia laevigata*, constatando que esta espécie possui tal atividade sobre linhagens de células tumorais OVCAR-8, SF-295, HCT-116 e HL-60. Esses dentre vários estudos demonstram que espécies pertencentes as Anonáceas possuem atividades citotóxicas sobre diversas linhagens de células tumorais.

Lima *et al.*[Lima **2016**], em estudos com o óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum,* realizaram ensaios citotóxicos sobre células tumorais MCF-7 utilizando o método colorimétrico do MTT. Os resultados demonstraram que o óleo essencial não foi eficaz contra as células cancerígenas na concentração de 40 µg/mL. No entanto, no presente estudo, o óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum* na concentração de 50 µg/mL, obtivemos inibição de 83,6% sobre as células tumorais MCF-7. Sendo assim, as amostras que foram capazes de inibir pelo menos 75% da proliferação em pelo menos uma das linhagens testadas foram consideradas ativas e selecionadas para o teste de curva com o objetivo de determinar a CI_{50}.

4 CONCLUSÕES

No presente trabalho, os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação utilizando aparelhagem do tipo Clevenger apresentou teor de 0,05 (%v/m) para as espécies *Protium heptaphyllum* e *Annona montana* e 0,7% para a espécie *Xylopia frutescens*.

A análise do óleo essencial de *Annona montana* possibilitou a identificação de 13 compostos, sendo os majoritários, o β-pineno 37,69%, (E)-cariofileno 17,55%, β-elemeno 12,68 %, α-pineno 6,29%,

biciclogermacreno 6,16% e o limoneno 5,96%, contribuindo assim para identificação fitoquímica do gênero *Annona*.

A análise do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* demonstrou que sua constituição compreende monoterpenos não oxigenados, sesquiterpenos não oxigenados e por sesquiterpenos oxigenados. Os principais constituintes foram (E)-cariofileno 21,78%, α-pineno 16,03%, 7-epi-α-selineno 8,97%, óxido de cariofileno 5,98%, γ-amorfeno 5,87%, limoneno 4,76% e o espatulenol 4,60%.

O óleo essencial de *Xylopia frutescens* é constituído em quase sua totalidade por sesquiterpenos não oxigenados (81,66%) e apenas um sesquiterpeno oxigenado, o óxido de cariofileno 0,80%. A caracterização do óleo essencial desta espécie apresentou o (E)-cariofileno 34,53%, *trans*-muurola-4(14),5-dieno 7,48%, α-copaeno 6,21%, δ-cadineno 5,67% e o *trans*-β-guaiano 5,08%, como constituintes majoritários.

No que tange aos bioensaios realizados para atividades larvicidas foi possível observar que o óleo essencial das folhas de *Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens* apresentaram uma eficaz atividade larvicida. Para a ação larvicida do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* foi encontrado uma CL_{50} de 112,878 ± 0,730 µg/mL no período de 24 horas. Para a atividade larvicida do óleo essencial de *Xylopia frutescens* foi encontrado uma CL_{50} de *Xylopia* CL_{50} de 143,606 ± 0,894 µg/mL. O óleo essencial de *Annona montana* não apresentou atividade larvicida até a concentração de 500 µg/mL.

Os monoterpenos α e β-pineno apresentaram atividade larvicida, com uma CL_{50} de 143,032 ± 2,067 µg/mL e 52,026 ± 0,939 µg/mL, respectivamente. Esses resultados sugerem que β-pineno pode ser um forte candidato da ação larvicida encontrada no óleo essencial de *Protium heptaphyllum,* mas que pode ter sofrido algum tipo de influência negativa (sinergismo) no óleo essencial de *Annona montana,* já que o mesmo não apresentou atividade larvicida.

No estudo da avaliação citotóxica *IN VITRO*, foi possível constatar que o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais MCF-7, NCI-H292 e HCT 116, apresentando uma CI_{50} de 44,25 µg/mL, 62,38 µg/mL e 18,63 µg/mL, respectivamente. Sendo esse o primeiro relato da atividade citotóxica do óleo essencial das folhas da espécie *Protium hepataphyllum* sobre as linhagens de células tumorais MCF-7, NCI-H292 e HCT 116. Nos testes citotóxicos realizados com o óleo essencial de *Xylopia frutescens* contra as linhagens de células tumorais MCF-7 e NCI-H292 obtivemos uma CI_{50} de 58,79 µg/mL e 41,19 µg/mL, respectivamente. O óleo essencial de *Annona montana* apresentou uma CI_{50} > 80 µg/mL, demostrando que o óleo essencial não foi eficaz contra as três linhagens de células tumorais testadas

Estudos como esse contribuem para a identificação e caracterização dos compostos voláteis presentes em espécies situadas na Floresta Nacional do Ibura em Sergipe e suas possíveis atividades biológicas e farmacológicas.

5 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Publicar um artigo sobre a composição química dos óleos essenciais de *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens* e suas respectivas atividades larvicidas e citotóxicas *IN VITRO*.

Realizar testes larvicidas e citotóxicos dos demais compostos majoritários identificados nos óleos essenciais deste estudo.

Publicar um artigo sobre os resultados dos testes larvicida e citotóxicos dos compostos majoritários identificados nos óleos essenciais deste estudo.

Estudar os compostos voláteis das espécies *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens* coletadas em outros locais dentro do estado de Sergipe.

Realizar testes inseticidas e repelentes dos óleos essenciais de *Annona montana, Protium heptaphyllum* e *Xylopia frutescens.*

6 ANEXOS (MATERIAL REPRODUZIDO DE REFERÊNCIA)

7 APÊNDICES (MATERIAL AUTORAL)

ANEXO II

CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DE EXAME DE QUALIFICAÇÃO, DEFESA DE DISSERTAÇÃO E DEFESA DE TESE DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM QUÍMICA

O CONSELHO do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe, no uso de suas atribuições legais, apresenta a relação de critérios utilizados na avaliação dos discentes submetidos aos Exames de Qualificação, Defesa de Dissertação e Defesa de Tese dos cursos de Mestrado e Doutorado em Química, os quais seguem:

- Apresentação oral do trabalho:
  - Estrutura, organização e clareza do material (*slides*) apresentado;
  - Capacidade oratória e domínio para transmitir a informação proveniente do seu trabalho;
  - Adequação do conteúdo e controle do tempo de apresentação.
- Documento:
  - Estrutura e organização do documento;
  - Clareza e uso adequado da linguagem científica;
  - Capacidade de discussão de resultados;
  - Revisão bibliográfica atualizada.
- Arguição:
  - Posicionamento e capacidade de resposta aos questionamentos;
  - Domínio do conteúdo do trabalho e dos conceitos a ele relacionado.

Conselho do PPGQ, 12 de maio de 2015

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr
PRESIDENTE