

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

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FRUTOS DA
ALMECEGA (*Protium Heptaphyllum* (Aubl.) Marchand)

Autor: Rodrigo Sebastião Cruvinel Cabral
Orientador: Dr. João Carlos Perbone de Souza

Rio Verde - GO
Agosto, 2019

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

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FRUTOS DA
ALMECEGA (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand)

Autor: Rodrigo Sebastião Cruvinel Cabral
Orientador: Dr. João Carlos Perbone de Souza

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

Rio Verde – GO
Agosto – 2019

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

Cabral , Rodrigo Sebastião Cruvinel Cabral
CC117c COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS FOLHAS E FRUTOS DA ALMECEGA (Protium
Heptaphyllum (Aubl.) Marchand) / Rodrigo Sebastião
Cruvinel Cabral Cabral ;orientador . João Carlos
Perbone de Souza Souza; co-orientadora Cássia
Cristina Fernandes Alves Alves. -- Rio Verde, 2019.
48 p.

Dissertação (em Programa de Pós graduação em
Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2019.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC – Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Rodrigo Sebastião Cruvinel Cabral
Matrícula: 2017203310310044
Título do Trabalho: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FRUTOS DA ALMECEGA (*Protium Heptaphyllum* (Aubl.) Marchand).

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 03/09/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

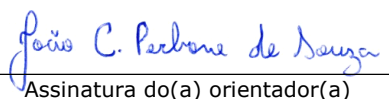
- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 20 de Agosto de 2020.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
 INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
 CAMPUS RIO VERDE - GO
 DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ATA Nº 59 (CINQUENTA E NOVE) BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove, às 14:00 (quatorze horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof.^a Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves (orientadora), Prof. Dr. José Mateus Kondo Santini (avaliador externo) e Prof. Dr. Eugênio Miranda Sperandio (avaliador externo), sob a presidência da primeira, em sessão pública realizada na Sala 53 do Pavilhão da Pesquisa e Pós-Graduação do IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, da autoria de **RODRIGO SEBASTIÃO CRUVINEL CABRAL**, discente do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Prof.^a Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da Dissertação para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, e procedida às correções recomendadas, a Dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM AGROQUÍMICA**, na área de concentração Agroquímica, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGAq da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade, se não cumprida essa condição, em até 60 (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, eu, Pâmella Trayci da Silva Gonçalves, secretária do PPGAq, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em quatro vias de igual teor.


 Prof. Dr. Eugênio Miranda Sperandio
Avaliador externo
 IF Goiano/Campus Rio Verde


 Prof. Dr. José Mateus Kondo Santini
Avaliador externo
 Faculdade Objetivo


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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Batista de Melo Cabral e Luthes Cruvinel Cabral, pelo amor e incentivo incondicional. Vocês são meus exemplos de determinação, coragem e humildade.

Ao meu orientador prof. Dr. João Carlos Perbone de Souza pela disponibilidade, atenção, conhecimentos a mim passados.

À minha coorientadora, prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves, pelo carinho, amizade, paciência durante todo esse tempo de orientação. Sou muito grato à Deus por colocar pessoas como você na minha vida, você é luz por onde passa. Você é o exemplo de docente que levarei para minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Mayker L. Dantas Miranda, pelo apoio, dedicação, profissionalismo e amizade durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Claudécir Goncalez do Instituto Federal Goiano, por me receber, me incentivar e encorajar. Sou muito grato.

Aos meus colegas de curso, em especial o Wendel Cruvinel que esteve comigo durante todos os experimentos.

À aluna de iniciação científica Hellen Regina que foi o meu braço direito e esquerdo durante todo o mestrado, muito obrigado por toda dedicação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pelo empenho e conhecimentos transmitidos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade concedida.

Muito Obrigado.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Possui graduação em Fisioterapia pela Universidade de Rio Verde, Especialização em Ortopedia, Traumatismo e Desportiva pelo Centro de Estudos Avançados e Formação Integrada. Em agosto de 2017, iniciou-se no curso de pós-graduação stricto sensu em Agroquímica, atuando na linha de pesquisa em química de produtos naturais.

Professor de Anatomia Humana e Neuroanatomia Humana da UniBras, antiga Faculdade Objetivo. Onde atua também como coordenador do curso de Fisioterapia, Coordenador dos cursos de Pós-Graduação e TecBras. Tem experiência na área de cerimonial, formatura e organização de eventos, simpósios, congressos, oficinas, encontros. Atua nos seguintes temas: Fisioterapia, Plantas medicinais e saúde.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
1.INTRODUÇÃO	13
1.1.Plantas Medicinais	13
1.2.Óleos Essenciais	14
1.3.Atividade antibacteriana dos Óleos Essenciais	16
1.4.Atividade leishmanicida dos Óleos Essenciais	16
1.5 <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	17
2.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
3.OBJETIVOS	24
CAPÍTULO I- Constituintes químicos e atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	25
RESUMO	25
1.INTRODUÇÃO	26
2. EXPERIMENTAL	27
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.CONCLUSÃO	30
5.REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO II-Composição química, efeitos leishmanicidas e citotóxicos in vitro de óleos essenciais de folhas jovens e adultas de <i>Protium heptaphyllum</i> (Burseraceae)	35
RESUMO	36
1.INTRODUÇÃO	36
2.PARTE EXPERIMENTAL	37
2.1.Material Vegetal	37
2.2.Extração de óleo essencial	37
2.3. Análises de CG-FID e CG-MS.....	37

2.4. Atividade antileishmanial contra formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	38
2.5. Teste de letalidade para artêmia	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Identificação dos componentes	39
3.2. Atividades antileishmanial e citotóxica	42
4. CONCLUSÃO	44
5. REFERÊNCIAS	44
6. CONCLUSÃO GERAL.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I-Constituintes químicos e atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand

Tabela 1. Constituintes químicos e atividade antibacteriana in vitro de óleos essenciais de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand.....29

CAPÍTULO II-Composição química, efeitos leishmanicidas e citotóxicos *in vitro* de óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae)

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de folhas de *P. heptaphyllum* segundo a idade da folha40

Tabela 2. Atividade leishmanicida dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *Protium heptaphyllum* contra formas promastigotas de *L. amazonenses*42

Tabela 3. Toxicidade in vitro dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *Protium heptaphyllum* contra *Artemia salina*.....43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania amazonensis</i> na Amazônia brasileira	18
Figura 2. Espécie de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand árvore	19
Figura 3. Partes da planta <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. (A) Folhas jovens. (B) Inflorescência. (C) Frutos maduros com exposição das sementes.....	20
CAPÍTULO II. Estruturas químicas dos sete principais constituintes identificados no óleo essencial de folhas jovens de <i>P. heptaphyllum</i> : β -cariofileno (1), β -elemeno (2), 1,8-cineol (3), α -pineno (4), óxido de cariofileno (5) e limoneno (6). Os principais constituintes do óleo essencial das folhas adultas foram apenas o β -cariofileno (1) e o guaiol (7).....	41

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

MIC.....	Concentração Mínima Inibitória
CH ₂ CL ₂	Diclorometano
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio anidro
CG-MS.....	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massa
PY-EO.....	Óleo essencial de folhas jovens
PA-EO.....	Óleo essencial de folhas adultas
OE.....	Óleo Essencial
RI _{exp}	Índice de Retenção determinado relativo
RI _{lit}	Índice de Retenção da literatura
RA%.....	Área Relativa
µg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitro
CHD*.....	Dicloridrato de clorexidina
CI.....	Concentração Inibitória

RESUMO

CABRAL, RODRIGO SEBASTIÃO CRUVINEL. C. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2019. **Composição química e atividade biológica do óleo essencial das folhas e frutos da almecega (*Protium heptaphyllum*)**. Dr. João Carlos Perbone de Souza “Orientador”, Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves “Coorientadora”, Dr. Mayker L. D. Miranda “Coorientador”.

A *Protium heptaphyllum*, que pertence à família Burseraceae, chamada popularmente de “almecega”, é uma classe de planta nativa e bem subdividida em várias regiões do Brasil. Estudos apontam que a maior parte da população nacional usa a medicina alternativa como fonte de recursos terapêuticos. Com o aumento da demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, o cultivo e/ou o extrativismo dessas plantas torna-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional. Diversos trabalhos já relataram o potencial medicinal do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*, porém não foram encontrados estudos comparativos, das folhas jovens e maduras e nem a composição química das folhas jovens, o teor de óleo essencial das folhas adultas e jovens, frutos verdes e maduros da mesma, no combate a agentes bactericidas e leishmanicidas. Assim, foram submetidos à hidrodestilação material vegetal e realizou-se a análise da composição química e atividade biológica do óleo essencial presente nas folhas e nos frutos de *P. heptaphyllum*. O material vegetal foi coletado na cidade de Iporá – GO entre 7h e 10h da manhã, posteriormente conduzido até o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde onde foram separadas as folhas dos frutos de *P. heptaphyllum*. O material então foi triturado e submetido à extração, em triplicata, por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger, por 4 h. Os hidrolatos obtidos foram submetidos à partição líquido-líquido com diclorometano (CH_2Cl_2), as frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Posteriormente, os compostos químicos foram identificados através de

cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG). Posteriormente, com os óleos essenciais avaliou-se a atividade do óleo no controle de *Bacteroides fragilis*, *Leishmania amazonenses* e também mofo branco. Os principais constituintes identificados nas folhas jovens foram: β -cariofileno (15,1%), β -elemeno (9,4%), 1,8-cineol (8,1%), α -pineno (7,5%), óxido de cariofileno (7,1%) e limoneno (6,5%), destacando α -Pineno (7,5%); 1, 8-cineol (8,1%); β -Elemeno (9,4%) e Óxido de cariofileno(7,1%) foram identificados em maior concentração na folhas jovens e o guaiol (7,5%) com maior concentração nas folhas adultas, dentre esses constituintes o β -cariofileno (15,0%) e guaiol (7,5%) são os compostos majoritários e o óleo extraído teve eficácia contra a espécie *Leishmania*. As folhas jovens da espécie *P. heptaphyllum* tiveram um maior efeito em comparação às folhas adultas contra a *L. amazonenses*. No OE de frutos verdes de *P. heptaphyllum* foram identificados os principais constituintes: mirceno (59,0%), germacreno D (10,6%), α -cadinol (8,8%) e β -elemeno (8,2%). O OE dos frutos maduros foram identificados os principais componentes: mirceno (31,2%), limoneno (12,9%), *trans*-nerolidol (9,8%) e espatulenol (7,8%) identificados por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa. O óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum* apresentou eficácia contra *Streptococcus mutans* (MIC = 50 μ g/mL) e contra *Streptococcus mittis* (MIC = 62.5 μ g/mL). Verificou-se também que o óleo dos frutos verdes e maduros tiveram ação contra *Prevotella nigrescens* (both, MIC = 50 μ g/mL). Com o desenvolvimento desse trabalho pôde afirmar a ação antibacteriana, ação antileishmanicida e atividade citotóxica do OE das folhas jovens e adultas e dos frutos de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand indicando sua utilização na área farmacêutica e cosmética dentre outras com intuito de diminuir o uso de produtos sintéticos que causam danos à saúde pública.

Palavras-chaves: Óleo essencial, plantas medicinais, atividade biológica, atividade antibacteriana, Leishmaniose.

ABSTRACT

CABRAL, RODRIGO SEBASTIÃO CRUVINEL. C. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde – GO, February of 2019. **Chemical composition and biological activity of the essential oil of leaves and fruits of the almecega (*Protium heptaphyllum*)**. Dr. João Carlos Perbone de Souza “Supervisor”, Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves “Co-supervisor”, Dr. Mayker L. D. Miranda “Co-supervisor”.

Protium heptaphyllum, which belongs to the Burseraceae family, popularly called “almecega”, is a class of native plant and well subdivided in several regions of Brazil. Studies show that the majority of the national population uses alternative medicine as a source of therapeutic resources. With the increase in demand for the use of medicinal plants to cure or prevent diseases, the cultivation and/or extraction of these plants has become an increasingly important alternative in national agriculture. Several studies have already reported the medicinal potential of the essential oil of *Protium heptaphyllum*, but comparative studies have not been found, of young and mature leaves, nor the chemical composition of young leaves, the essential oil content of adult and young leaves, green and ripe fruits. Of the same, in the fight against bactericidal and leishmanicidal agents. Thus, the plant material was subjected to hydrodistillation and the chemical composition and biological activity of the essential oil present in the leaves and fruits of *P. heptaphyllum* were analyzed. The plant material was collected in the city of Iporá - GO between 7 am and 10 am, and subsequently taken to the Natural Products Chemistry Laboratory of the Federal Goiano Institute - Rio Verde Campus where the leaves of the fruits of *P. heptaphyllum* were separated. The material was then crushed and submitted to extraction, in triplicate, by steam dragging in a Clevenger type apparatus, for 4 h. The hydrolates obtained were subjected to liquid-liquid partition with dichloromethane (CH₂Cl₂), the organic fractions were combined and dried with

anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4). Subsequently, the chemical compounds were identified through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC). Subsequently, with the essential oils, the activity of the oil was evaluated in the control of *Bacteroides fragilis*, *Leishmania amazonenses* and also white mold. The main constituents identified in the young leaves were: β -karyophyllene (15.1%), β -elemene (9.4%), 1,8-cineole (8.1%), α -pinene (7.5%), caryophyllene oxide (7.1%) and limonene (6.5%), highlighting α -Pinene (7.5%); 1,8-cineole (8.1%); β -Elemene (9.4%) and karyophyllene oxide (7.1%) were identified in a higher concentration in young leaves and guaiol (7.5%) with a higher concentration in adult leaves, among these constituents β -karyophyllene (15.0%) and guaiol (7.5%) are the major compounds and the extracted oil was effective against the *Leishmania* species. Young leaves of the species *P. heptaphyllum* had a greater effect in comparison to adult leaves against *L. amazonenses*. In the OE of *P. heptaphyllum* green fruits, the main constituents were identified: myrcene (59.0%), germacrene D (10.6%), α -cadinol (8.8%) and β -element (8.2%). The OE of ripe fruits identified the main components: myrcene (31.2%), limonene (12.9%), trans-nerolidol (9.8%) and spatulenol (7.8%) identified by gas chromatography coupled with mass spectrum. The essential oil from the leaves of *P. heptaphyllum* showed efficacy against *Streptococcus mutans* (MIC = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and against *Streptococcus mittis* (MIC = 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$). It was also found that the oil of green and ripe fruits had an action against *Prevotella nigrescens* (both, MIC=50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). With the development of this work, he was able to affirm the antibacterial action, antileishmanicidal action and cytotoxic activity of the OE of young and adult leaves and of the fruits of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, indicating its use in the pharmaceutical and cosmetic area, among others, in order to reduce the use. of synthetic products that cause damage to public health.

Key words: Essential oil, medicinal plants, biological activity, antibacterial activity, Leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais

Diversos trabalhos demonstram o poder da natureza, e desde então se utiliza das plantas como fonte de alimentos, bebidas, pigmentos, fibras têxteis e materiais para a construção de moradias e meios de transporte, também conseguiu-se isolar compostos e moléculas com potencial farmacológico, tais como taninos, flavonoides, fenois, alcaloides, terpenoides, entre outras classes DA SILVA et al. (2016).

As plantas têm papel fundamental no desenvolvimento da humanidade, elas são usadas pelo homem, na alimentação, na cura de doenças e na agricultura. Estas possuem substâncias biologicamente ativas, que são conhecidas na atualidade como metabólitos secundários (FARAG et al., 2018). Tal conhecimento é de grande valor para as gerações atuais. A etnofarmacologia fornece pistas sobre substâncias potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos baseado em observações feitas em diversas áreas como química, bioquímica, botânica, farmacologia e antropologia (DONSÌ & FERRARI., 2016; MAIA et al., 2015).

O interesse da indústria farmacêutica pela procura de substâncias vegetais biologicamente ativas foi reativado na década de 90, embora avanços tecnológicos importantes tenham sido conquistados pela química sintética, muitos compostos bioativos isolados de plantas são formados por misturas de moléculas complexas, tornando sua obtenção no laboratório um processo por vezes inviável (WALSH & FISCHBACH, 2010).

O interesse pelas pesquisas em produtos encontrados na natureza é que esses apresentam enorme diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, das quais cerca de 60 % dos óleos essenciais possuem ação antifúngica e 35 % possuem ação antibacteriana. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais às antimicrobianas a eles associados (EMBRAPA, 2017; OLIVEIRA et al., 2006; SEAB, 2016).

Com intenso desmatamento das florestas e matas para utilização da agropecuária e plantio de lavouras, coloca em risco de extinção inúmeras espécies nativas, o que pode causar distúrbios ecológicos. Considerando-se o valor das plantas medicinais não apenas como recurso terapêutico, mas também como fonte de recurso econômico, torna-se importante estabelecer linhas de ação voltadas para o desenvolvimento de técnicas de manejo ou cultivo, tendo em vista a utilização dessas espécies vegetais pelo homem aliada à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas tropicais (SAMPAIO et al., 2017; FILHO et al., 2016; MELLO et al., 2016; BALDIN & PEREIRA, 2010).

Muitas espécies de reino vegetal são caracterizadas por ter uma grande produção de óleo essencial com possibilidades de exploração econômica, como ocorrem com as espécies de Citros e eucalipto, outras que tem o potencial antifúngico importante na agricultura (FONSECA et al., 2015).

As espécies de Burseraceae são conhecidas pelas suas folhas, cascas e resinas que são ricas em óleos essenciais, triterpenos e outros constituintes. Algumas espécies desta família produzem óleo essencial que possuem potenciais de aplicação na perfumaria e na medicina popular a enorme diversificação das espécies de plantas no Brasil e fornece grande viabilidade econômica (RUDIGER et al., 2009; SIANI et al., 2011).

A família Burseraceae compreende 18 gêneros com 700 espécies divididas em três tribos: Protieae (três gêneros), Canarieae (oito gêneros) e Bursereae (sete gêneros). O gênero Protium (Tribo Protieae) é o principal membro da família com 150 espécies. Todas as Tribos são nativas da América, África e trópicos indo-asiáticos, com a maior diversidade encontrado no Hemisfério Sul (WEEKS et al., 2005).

1.2. Óleos Essenciais

O óleo essencial pode ser extraído de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas. Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (FILHO, et al., 2016; PEREIRA, et al., 2018).

Os óleos essenciais apresentam um grande potencial como agente antimicrobiano, isto se deve à presença de vários tipos de aldeídos, terpenos e

compostos fenólicos ativos que atuam em variados patógenos. O óleo essencial de *Psidium guajava* L. apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*. Bactérias deste gênero são responsáveis pela cárie que é considerada um problema na saúde pública, além de outras doenças como a bacteremia, endocardite e meningite (SILVA et al., 2018; DI VITO et al., 2019; DELORME et al., 2015).

De acordo com Harkat-madouri et al. (2015) o estudo de plantas com propriedades farmacêuticas tem sido bastante utilizadas na prevenção de doenças, cada vez mais são usados como alternativa ao tratamento tradicional. No referido trabalho o óleo essencial das folhas de *Eucalyptus globulus* também foi eficiente contra bactérias periodontopatogênicas.

Existem 300 tipos de OE utilizados nas indústrias farmacêuticas como aromatizantes, fixadores de fragrâncias, dentre os 3000 já catalogados, são comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo com isso, substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al., 2009; DONSI & FERRARI, 2016; MAIA et al., 2015).

Fisicamente, os OE's se apresentam no estado líquido em temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras (SILVEIRA et al., 2015).

Os óleos essenciais são utilizados nas indústrias farmacêuticas para fabricação de cosméticos e perfumarias e farmacologicamente com fins medicinais indústrias alimentícias como conservadores (PEREIRA, 2017). Peixinho et al. (2019) afirma que o fato de serem naturais e biodegradáveis, geralmente apresentam baixa toxicidade à saúde pública, é uma opção o uso de OE.

Os óleos são compostos por terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides entre outros, são de elevado interesse científico sendo de grande importância estudos relacionados às atividades biológicas (FILHO & YUNES 1998; STERMITZ, et al., 2000; CARINI, et al., 2015; MARQUES et al., 2017).

A atividade dos OE engloba ação fitoterápica, antiviral, antisséptica, nutricional, antifúngica, entre outras, incluindo também a atividade bacteriostática e /ou bactericida exercida principalmente por compostos terpenóides, no entanto, a composição e a atividade de um óleo essencial podem ser modificadas por vários

aspectos, desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela está inserida, fatores estes que estão detalhados adiante (AMORATI et al., 2013; MIRANDA et al., 2016).

1.3. Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados tem sido descrita através de pesquisas envolvendo diversas espécies de plantas e microrganismos testados. Em revisão sobre o assunto, Greay & Hammer (2015) cita alguns dos mecanismos por meio dos quais estes compostos atuam sobre células bacterianas. Os monoterpenos interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. Di Pasqua et al., 2010 verificaram a ação do timol contra salmonela na conservação de alimentos e vários outros estudos mostram que a atividade bactericida dos óleos essenciais de algumas plantas não envolveu lise celular, porém a parede celular de algumas células bacterianas sofreu afinamento, e percebeu-se a perda da homogeneidade do conteúdo celular pela formação de grânulos citoplasmáticos,(GUINOISEAU et al., 2010).

1.4. Atividade Leishmanicida de Óleos Essenciais

As doenças parasitárias, estão presentes em praticamente todo o território brasileiro, cujo tratamento cada vez mais se limita à utilização de medicamentos farmacêuticos. Este é o caso da leishmaniose visceral, causada por duas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, doença infecciosa, não contagiosa, endêmica ao redor do mundo e que afeta mais de 12 milhões de pessoas (ANDRADE et al., 2009; LIMA & BATISTA, 2009).

O tratamento desta doença ainda é bastante complexo, visto que o medicamento deve ser administrado por profissionais da saúde e com o paciente hospitalizado. No Brasil, é preconizado pelo Ministério da Saúde e baseia-se, principalmente no antimoniato de N-metilglucamina e Anfotericina B, levando em consideração a idade, co-morbidades e gestação dos pacientes que utilizam-se destes medicamentos (LISBOA et al., 2016).

A associação entre conhecimento popular de plantas com potencial farmacológico, prospecção fitoquímica visando isolar as moléculas bioativas importantes na produção de novos fitoterápicos tem grande importância na busca por

medicamentos que atuem no tratamento da leishmaniose, além de fornecer subsídios para a implantação de políticas públicas para a conservação da biodiversidade do país (BUSATO, 2014).

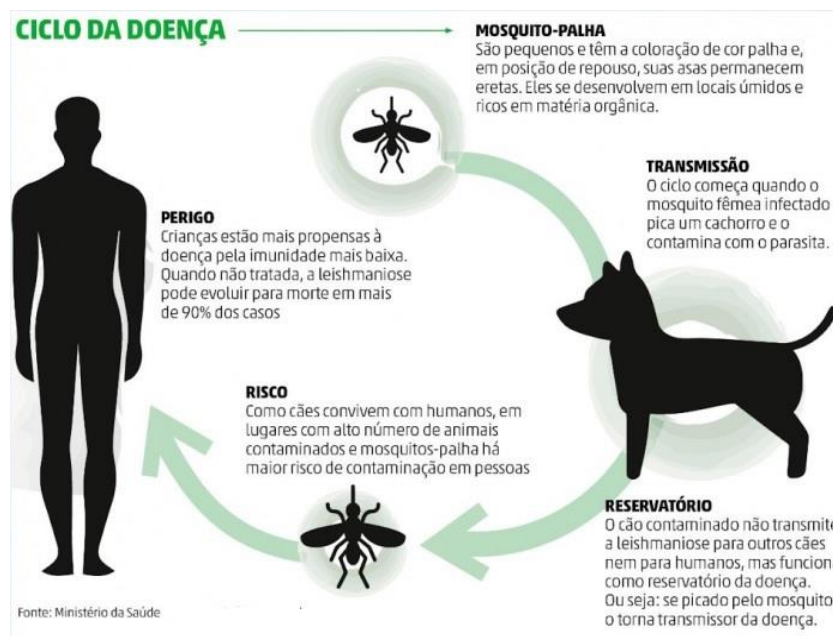


Figura 1. Ciclo de transmissão da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na Amazônia brasileira. FONTE: Coelho, 2010.

1.5. *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand

Protium heptaphyllum (Aubl.) Marchand é uma árvore da família das Burseraceae, de solo arenoso úmido ou seco e que atinge 10-20 m de altura. Estão amplamente espalhadas por regiões tropicais e subtropicais, principalmente na Floresta Amazônica e em alguns estados nordestinos, como Bahia, Ceará, Piauí, assim como em outros países da América do Sul (Colômbia, Paraguai, Suriname e Venezuela (PONTES et al., 2007; MOBIN et al., 2016)). Conhecida popularmente como almecega, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira vermelha ou almecegueiro bravo, devido às suas propriedades aromáticas, o óleo-resina da almacegueira é amplamente usado em perfumes e produtos de higiene pessoal. O seu óleo essencial é utilizado na medicina popular como um anti-inflamatório, analgésico, cicatrização de feridas e agente estimulador, e para o tratamento de inúmeras doenças (ARAÚJO et al., 2011; LIMA et al., 2016).

Também é reconhecido pelo uso de suas folhas e cascas como hemostáticas, cicatrizantes e anti-inflamatórias, sendo usado pelos nativos também como descongestionante nasal (ARAÚJO, 2012; LORENZ & MATOS, 2008).



Figura 2. Espécie de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand árvore. Fonte: Rodrigues, 2017.

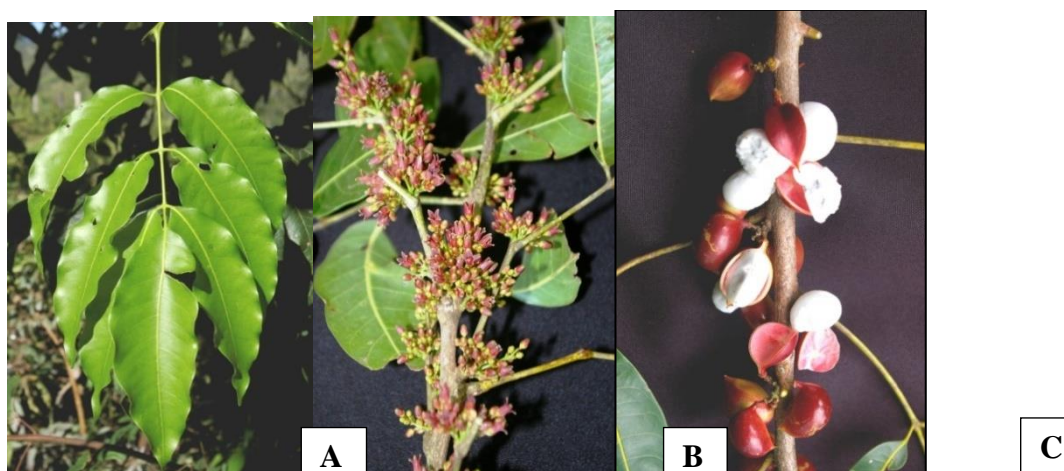


Figura 3. Partes da planta *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (A) Folhas jovens. (B) Inflorescência. (C) Frutos maduros com exposição das sementes. Fonte: Pereira, 2017.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; ARRUDA, C.C.P.; SANTOS, M.F.C.; ROCCA, M.E.G.; AQUINO, R.B. Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, State of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.5, p.488-493, 2009.

AMORATI, R.; FOTI, M.C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.46, p.10835-10847, 2013.

ARAUJO, D.A.O.V. **Avaliação da gastroproteção do óleo essencial do *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae) bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos em modelos de úlcera gástrica em ratos.** 2012, 127f. Dissertação (mestrado em Farmacologia) apresentada Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

ARAUJO, D.A.; TAKAYAMA, C., FARIA, F.M.; SOCCA, E.A.; DUNDER, R.; MANZO, L.P. Efeitos gastroprotetores do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* em modelos experimentais de úlcera gástrica em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.21, n.4, p.721-729, 2011.

BALDIN, E.L.L.; PEREIRA, J.M. Resistência de genótipos de feijoeiro a *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae). **Ciência Agrotecnologia**, v.34, n.6, p.1507-1513, 2010.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v.78, n.5, p.431-441, 2005.

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

BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; COSTA, A. O. S.; JUNIOR, E. F. C. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural**, v.44, n.9, p.1574-1582, 2014.

CARINI, J. P.; LEITAO, G. G.; SCHNEIDER, P. H.; SANTOS, C. C.; COSTA, F. N.; HOLZSCHUH, M. H.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high-speed countercurrent chromatography. **Current pharmaceutical biotechnology**, v.16, n.1, p.66-71, 2015.

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

DALY, D.C. 2015 Burseraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16660>>. Acessado em: 21 de Abr. 2017.

DI PASQUA, R.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella* enterica serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, p.1040–1049, 2010.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Nanoemulsões de óleos essenciais como agentes antimicrobianos em alimentos. **Journal of Biotechnology**, v.233, p.106-120, 2016.

EMBRAPA. Embrapa soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acessado em: 19 de Out. 2017.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.1, p.69-75, 2001.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213–226, 2008.

FILHO, C.V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FILHO, J.E.G.; PÁDUA, L.E.M.; PESSOA, E.F.; SILVA, P.R.R. Antibiosis and antixenosis of lima bean to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-6, 2016.

FONSECA, M.C.M.; LEHNER, M.S.; GONÇALVES, M.G.; PAULA JÚNIOR, T.J.; SILVA, A.F.; BONFIM, F.P.G.; PRADO, A.L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p.71-80, 2003.

GREAY, S.J.; HAMMER, K.A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v.14, n.1, p.1–6, 2015.

GUINOISEAU, E.; LUCIANI A.; ROSSI, P.G.; QUILICHINI, Y.; TERNENGO, S.; BRADESI, P.; BERTI, L. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 873–879, 2010.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE prevê safra de grãos 6,8% menor em 2018. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/19474-ibge-preve-safra-de-graos-6-8-menor-em-2018.html>>. Acessado em 12 de Mar. de 2018.

LIMA, E.M.; CAZELLI, D.S.P.;PINTO, F.E.;MAZUCO, R.A.;KALIL, I.C.;LENZ, D.;SCHERER, R.;ANDRADE, T.U.;ENDRINGER, D.C. Óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum*: composição química, citotoxicidade, atividade antimicrobiana e antimutagenicidade. **Revista Farmacognosia**, v.12, n.1, 2016.

LIMA, M.B.; BATISTA, E.A.R. Epidemiologia da leishmaniose visceral humana em fortaleza-CE. **Revista Brasileira em Promoção à Saúde**, v.22, n.1, p. 16-23, 2009.

LISBOA, A.R.; PINHEIRO, A.A.V.; DANTAS, A.E.F.; OLIVEIRA, I.B.; EVANGELISTA, T.R.; PEREIRA, K.K.E.A. Leishmaniose visceral: Uma revisão literária. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 6, n.2, p. 35-43, 2016.

MARQUES, A.M.; FINGOLO, C.E.; KAPLAN, M.A. HSCCC separation and enantiomeric distribution of key volatile constituents of *Piper caussenianum* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). **Food Chemical Toxicology**. p. 1-7, 2017.

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

MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítios da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 391-399, 2004.

MELLO, M. B.; BOTREL, P. P.; TEIXEIRA, I. R. V.; FIGUEIREDO, F. C.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Atividade inseticida do óleo essencial de *Hiptis marrubioides* no controle de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Revista Agrogeoambiental**, v. 6, n. 1, p. 79-86, 2016.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L.R.; RODRIGUES, L.M.A.; FIGUEIREDO, A.C.S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.

MOBIN, M.; DE LIMA, S.G.; ALMEIDA, L.T.G.; TAKAHASHI, J.P.; TELES, J.B.; SZESZS, M.W.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, A.A.; MELHEM, M.S.C. MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.2, p.531-538, 2016.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; FILHO, R.N.S. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

PEIXINHO, G.S.; RIBEIRO, V.G.; AMORIM, E.P.R.; MELO, M.A.C. Ação do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon nardus* L) sobre o patógeno *Lasiodiplodia theobromae* em cachos de videira cv. Itália. **Summa Phytopathol**, v.45, n.4, p.428-431, 2019.

PEREIRA, A.I.S. **Atividade antibacteriana e caracterização físicoquímica de óleos essenciais extraídos das plantas medicinais comumente utilizadas pela população de São Luís do Maranhão**. 2017, 104f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2017.

PEREIRA, B.A.S. Árvores do bioma cerrado. Disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/03/30/protium-heptaphyllum-aubl-marchand-subesp-heptaphyllum>.

PEREIRA, M.N.; CONCEIÇÃO, R.B.; CRUZ, J.C.S.; ANDRADE, M.C.N. Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Thielaviopsis paradoxa*. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.14, n.3, p.513-521, 2018.

PONTES, W.J.T.; OLIVEIRA, J.C.G.; CÂMARA, C.A.G.; LOPES, A.C.H.R.; GONDIM JÚNIOR, M.G.C.; OLIVEIRA, J.V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M.O.E. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). **Revista Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 103-110, 2007.

RODRIGUES, M.I.A. **Anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) com ênfase no sistema secretor em ambiente com influência das marés**. 2017, 131f. Tese (Doutorado em Botânica) apresentada ao Instituto de Biociências. Botucatu, 2017.

RÜDIGER, A.L.; SILVA, C.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. EDXRF analysis of Amazonian Burseraceae oleoresins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1077-1081, 2009.

SAMPAIO, A.A.; FONTES, L.S.; BARBOSA, D.R.S.; LIMA, V.M.G.C. Bioatividade dos extratos aquosos de folhas de pimenta malagueta e eucalipto sobre *Zabrotes subfasciatus* em grãos de fava. **Revista Verde**, v. 12, n. 2, p. 198-203, 2017.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.154-159, 2010.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Feijão - Análise da conjuntura Agropecuária. 2016.

SIANI, A.C.; NAKAMURA, M.J.; TAPPIN, M.R.R.; MONTEIRO, S.S.; GUIMARÃES, A.C.; RAMOS, M.F.S. Chemical Composition of South American Burseraceae Non-volatile Oleoresins and Preliminary Solubility Assessment of their Commercial Blend. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 529-539, 2012.

SILVA, G.L.; LUFT, C; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R.H.; MELO, D.A.S.; DONADIO, M.V.F.; NUNES, F.B.; AZAMBUJA, M.S.; SANTANA, J.C.; MORAES, C.M.B.; MELLO, R.O.; CASSEL, E.; PEREIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, J.R. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1397-1408, 2015.

SILVEIRA, J.C.; COSTA, A.O.S.; COSTA JUNIOR, E.F. Modelagem da extração de óleos essenciais empregando coeficiente de difusão variável. **Revista de Engenharia Agrícola**, v.35, n.2, p.302-312, 2015.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, 2005.

STERMITZ, F.R.; LORENZ, P.; TAWARA, J.N.; ZENEWICZ, L.A.; LEWIS, K. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1433-1437, 2000.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, H.; DANIELE, C.; SAIJA, U.; MAZZANTI, L.; BISIGNANO, L. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

WALSH, C.T.; FISCHBACH, M.A. Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.8, p.2469–2493, 2010.

WEEKS, A.; DALY, D.C.; SIMPSON, B.B. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (*burseraceae*) based on nuclear and chloroplast sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.35, n.1, p.85-101, 2005.

WYBRANIEC, S.; STALICA, P.; JERZ, G.; KLOSE, B.; GEBERS, N.; WINTERHALTER, P.; SPÓRNA, A.; SXALENIEC, M.; MIZRAHI, Y. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1216, n.41, p.6890-6899, 2009.

OBJETIVOS

Avaliar o teor de rendimento e a composição química do óleo essencial das folhas e frutos de *Protium heptaphyllum*;

Avaliar a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos da almecega (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand).

Avaliar a atividade bacteriostática do óleo essencial das folhas, frutos verdes e maduros de *Protium heptaphyllum*;

Avaliar a atividade leishmanicida do óleo essencial das folhas adultas e folhas jovens de *Protium heptaphyllum*;

CAPÍTULO I - Constituintes químicos e atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand

(Artigo publicado na Revista Natural Product Research. 2018)

RESUMO

Muitos óleos essenciais (OE) de diferentes espécies vegetais têm efeitos antimicrobianos interessantes nos microrganismos que causam cárie dentária e doenças periodontais. OE's de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand foram analisados por cromatografia gasosa (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). O óleo essencial das folhas é rico em hidrocarbonetos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Os três principais compostos identificados foram β -elemeno (17,2%), espatulenol (12,6%) e α -cubebeno (11,6%). O OE dos frutos verdes é composto principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos e os principais componentes são mirceno (59,0%), germacreno D (10,6%), α -cadinol (8,8%) e β -elemeno (8,2%). O OE dos frutos maduros é composto principalmente de hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, e os principais componentes são mirceno (31,2%), limoneno (12,9%), *trans*-nerolidol (9,8%) e espatulenol (7,8%). A atividade antibacteriana dos OE's de *P. heptaphyllum* contra um painel de patógenos orais foi investigada em termos de suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) usando o método de microdiluição em caldo. Os OE's dos frutos maduros e verdes mostraram a mais forte atividade antibacteriana contra a bactéria anaeróbica *Prevotella nigrescens* (CIM = 50 μ g/mL). O óleo essencial das folhas apresentou atividade muito promissora contra *Streptococcus mutans* (CIM = 50 μ g/mL) e *Streptococcus mitis* (CIM = 62,5 μ g/mL). Os óleos essenciais de *P. heptaphyllum* exibiram também atividade antibacteriana moderada contra todos os outros microrganismos aeróbios e anaeróbios testados, com valores de CIM variando entre 100

e 400 µg/mL. Este é o primeiro relato do perfil químico dos óleos essenciais extraídos de frutos verdes e maduros de *P. heptaphyllum*. Além disso, a atividade bacteriana dos OEs contra patógenos orais também foi descrita pela primeira vez. Os resultados sugerem que o *P. heptaphyllum*, uma planta brasileira, fornece evidências iniciais de uma fonte nova e alternativa de substâncias com interesse medicinal.

Palavras-chave: *Protium heptaphyllum*; óleos essenciais; bactérias cariogênicas; patógenos orais; atividade antibacteriana.

1. Introdução

Cáries dentárias e doenças periodontais estão associadas a patógenos orais, principalmente bactérias. As bactérias cariogênicas e periodontopáticas presentes na cavidade oral formam um biofilme (placa dentária) aderente, estrutural e funcionalmente organizado na superfície dos dentes (Bardají et al., 2016; Santiago et al., 2018). Especificamente, as lesões de cárie representam 2% da carga total de doenças humanas e representam cerca de 4,6% dos gastos médicos em todo o mundo (Tonetti et al., 2017). O *Streptococcus mutans* é o principal microrganismo responsável pelo aparecimento de cáries (Krzyściak et al., 2014). Por sua vez, microrganismos como *Streptococcus salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis* e *Actinomyces*, *Bacteroides* e *Prevotella* sp causam periodontite ao aderir à superfície do dente para formar um biofilme oral (Franca et al., 2014; Benachinmardi et al., 2015; Teixeira et al., 2016; Zhang et al., 2017). O procedimento mais eficiente para prevenir a cárie dentária é a remoção do biofilme por escovação e uso do fio dental. No entanto, a maioria das pessoas falha em manter um nível de controle suficiente apenas através da remoção mecânica, o que exigiu o uso de produtos orais contendo ingredientes antimicrobianos como medida complementar para reduzir a formação de biofilme na superfície do dente (Aguiar et al., 2013; Melo et al., 2017). A clorexidina é o padrão anticariogênico atual, mas o uso regular de produtos de higiene bucal contendo esse produto químico geralmente causa vários efeitos colaterais (Gonçalves et al., 2017). Nesse cenário, alguns óleos essenciais extraídos de diferentes plantas têm atividade antimicrobiana *in vitro* promissora contra bactérias patogênicas orais (Tardugno et al., 2018). O *Protium heptaphyllum* (Burseraceae) é conhecido popularmente no Brasil como almecega, breu e almíscar. Várias propriedades biológicas foram relatadas para a família Burseraceae, como atividades anti-inflamatórias, antiulcerosas, anti-hiperlipidêmicas, antitumorais e

hepatoprotetoras (Araujo et al., 2011; De Lima et al., 2016; Mobin et al., 2016). Além disso, este é o primeiro relato do perfil químico dos óleos essenciais extraídos dos frutos de *P. heptaphyllum*. Considerando que trabalhos recentes demonstraram a atividade anticâncer de plantas medicinais (Mohieldin et al., 2017), neste estudo, investigamos a composição química e os efeitos antibacterianos *in vitro* do óleo essencial extraído das folhas e frutos verdes e maduros de *Protium heptaphyllum*, onde a atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de frutos verdes e maduros e folhas de *P. heptaphyllum* contra patógenos orais não foi investigada na literatura até o momento.

2. Experimental

O material vegetal foi coletado no “Instituto Federal Goiano - Campus Iporá” na cidade de Iporá (16 ° 24'14.9"S e 51 ° 06'40.0"W), Estado de Goiás, Brasil, em julho de 2017, às 9 horas. A planta foi identificada pela botânica Luzia Francisca de Souza e um espécime de *Protium heptaphyllum* (HJ1036) foi depositado no professor Germano Guarim Neto, do Herbarium Jataiense.

Os óleos essenciais de *P. heptaphyllum* foram extraídos de folhas e frutos maduros e verdes por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 2 h. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. O material vegetal foi dividido em três amostras de 500 g cada, e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta dos óleos essenciais (OEs), os traços de água remanescentes no óleo foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. Os OE foram armazenados em vidro de cor âmbar e mantidos em geladeira a 4°C até a análise. O rendimento de OE (% m/m), foi calculado em relação à massa foliar à base úmida, massa foliar à base seca e massa foliar seca à temperatura ambiente e dos frutos verdes e maduros. Os EOs foram dissolvidos em hexano e analisados por detector de ionização por cromatografia em fase gasosa (CG-FID) e espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (GC-MS) usando os sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna no CG-FID foi programada para subir de 60 para 240°C a 3°C / min e foi mantida a 240°C por 5 minutos; tendo como gás transportador o hidrogênio (H₂) a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µL (proporção de divisão de 1:10) e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas normalizando as áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média das

análises CG-FID em triplicata. As condições do CG-MS e a identificação dos óleos essenciais foram previamente relatadas (Melo et al., 2015). A identificação dos componentes voláteis dos óleos essenciais de *P. heptaphyllum* (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,250 µm) nas mesmas condições operacionais usadas para CG em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C8-C20). As estruturas foram compatíveis com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos OE foram calculados usando o método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços. Foram utilizadas as seguintes cepas padrão do ATCC: *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039) e *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563). Colônias individuais de 24 horas formadas em ágar-sangue (Difco Labs, Detroit, Mich, EUA) foram suspensas em 10,0 mL de caldo de soja trípico (Difco). A padronização de cada suspensão de microrganismos foi realizada conforme descrito anteriormente (Ferreira et al., 2010). As amostras de OE foram dissolvidas em DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 1 mg/mL e diluídas em caldo de soja trípico (Difco), de modo a obter concentrações na faixa de 400 a 3,9 µg/mL. A concentração final de DMSO foi de 5% (v/v) e esta solução foi usada como controle negativo. Um poço inoculado foi incluído para controlar a adequação do caldo para o crescimento do organismo. Um poço não inoculado livre de agente antimicrobiano também foi incluído para garantir a esterilidade média. O dicloridrato de clorexidina (CHD) (C8527 Sigma) foi dissolvido em caldo de soja trípico (Difco) e usado como controle positivo em concentrações variando de 59,0 a 0,115 µg/mL. As microplacas (96 poços) foram seladas com filme plástico e incubadas a 37°C por 24 h, como descrito acima. Após a incubação, 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% (199303 Sigma, Stl Louis, MO, EUA) foram vertidos em cada poço da microplaca para indicar a viabilidade do microrganismo. Os valores de MIC foram determinados como a menor concentração de OE capaz de inibir o crescimento de microrganismos. Foram realizados três ensaios replicados para cada microrganismo.

3. Resultados e discussão

Os três principais compostos identificados no óleo essencial das folhas foram β -elemeno (17,2%), espatulenol (12,6%) e α -cubebeno (11,6%). Os principais componentes do óleo essencial de frutos verdes foram mirceno (59,0%), germacreno D (10,6%), α -cadinol (8,8%) e β -elemeno (8,2%). O óleo essencial de frutos maduros é composto principalmente por mirceno (31,2%), limoneno (12,9%), *trans*-nerolidol (9,8%) e espatulenol (7,8%) (Tabela S1). Os compostos foram identificados por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Trabalhos anteriores sobre os óleos essenciais de folhas e frutos obtidos de outras amostras de *Protium heptaphyllum* identificaram os seguintes terpenos como constituintes principais: α -copaeno, *trans*-cariofileno, mirceno, α -humuleno, germacreno B, α -pineno, β -pineno, limoneno, α -phandandrene e terpinoleno (Bandeira et al., 2001; Carvalho et al., 2013), no entanto, o perfil químico dos óleos essenciais de frutos maduros e verdes é descrito pela primeira vez na literatura. A composição química descrita no presente estudo foi semelhante à composição química já relatada na literatura para outras espécies pertencentes ao mesmo gênero e à família Burseraceae (Murthy et al., 2016).

Tabela 1. Efeito inibidor *in vitro* de óleos essenciais de *P. heptaphyllum* contra bactérias orais aeróbias e anaeróbias.

Microorganismos		Concentração mínima inibitória (CMI - $\mu\text{g/mL}$)			CHD*
		Amostra de óleo essencial			
		Leaf	Unripe Fruit	Ripe Fruit	
Anaerobias	<i>Actinomyces naeslundii</i> ^b	400	100	100	1.884
	<i>Bacteroides fragilis</i> ^a	400	100	100	1.884
	<i>Prevotella nigrescens</i> ^a	200	50	50	1.884
Aerobias	<i>Streptococcus mitis</i> ^b	62.5	250	250	3.688
	<i>Streptococcus mutans</i> ^b	50	250	250	0.922
	<i>Streptococcus sanguinis</i> ^b	100	250	250	0.922
	<i>Streptococcus sobrinus</i> ^b	400	250	250	0.922

^aBactérias Gran-negativa; ^bBactéria Gram-positiva; CHD*: dicloridrato de clorexidina (controle positivo).

A Tabela 1 lista as MIC dos ensaios antibacterianos *in vitro* de óleos essenciais de *P. heptaphyllum* contra as principais bactérias que causam cárie e periodontite. O OE extraído das folhas de *P. heptaphyllum* exibiu forte atividade contra *Streptococcus*

mutans (CIM = 50 µg/mL) e *S. mitis* (CIM = 62,5 µg/mL). Além disso, os óleos essenciais de frutos verdes e maduros exibiram forte atividade contra *Prevotella nigrescens* (ambos, CIM = 50 µg/mL). Os óleos essenciais investigados foram moderadamente ativos contra as outras bactérias testadas, com valores de CIM entre 100 e 400 µg/mL. De acordo com Vieira et al. (2017), a atividade antibacteriana pode ser considerada boa quando os valores de CIM estão abaixo de 100 µg/mL e moderada de 500 a 100 µg/mL. Este é um resultado interessante, pois sabe-se que poucos compostos naturais inibem *S. mutans*, um dos principais agentes causadores de cárie dentária (Melo et al., 2017). Presume-se que os compostos não polares difundem-se facilmente através das membranas celulares e matem os microrganismos, afetando as vias metabólicas ou organelas bacterianas. Além disso, esses compostos podem interagir com a membrana bacteriana e induzir mudanças fisiológicas drásticas, causando perda de permeabilidade da membrana, o que leva à morte celular (Vieira et al., 2017). Ademais, possíveis interações sinérgicas entre os componentes do óleo essencial são benéficas para sua atividade (Carneiro et al., 2017). Os principais constituintes dos óleos essenciais de *P. heptaphyllum* têm reconhecida atividade antibacteriana já descrita na literatura (Radulovic et al., 2013; Swamy et al., 2016). A presença desses compostos explica a boa ação antibacteriana dos óleos essenciais. No entanto, são necessários estudos adicionais antes da utilização dos óleos essenciais de *P. heptaphyllum* no campo da odontologia, especialmente em sua ação contra o *Streptococcus sobrinus*, o *Streptococcus salivarius*, o *Streptococcus mutans*, o *Streptococcus mitis*, o *Streptococcus sanguinis*, o *Bacteroides fragilis*, o *Actinomyces naeslundii* e o *Prevotella nigriscens*.

1. Conclusão

Este é o primeiro relato do perfil químico dos óleos essenciais extraídos de frutos verdes e maduros de *P. heptaphyllum*. A atividade antibacteriana de óleos essenciais de frutos verdes e maduros e folhas de *P. heptaphyllum* contra patógenos orais também é descrita pela primeira vez. O óleo essencial das folhas apresenta atividade antibacteriana, com forte atividade contra *Streptococcus mutans* e *S. mitis*. Os óleos essenciais de frutos verdes e maduros de *P. heptaphyllum* exibiram forte atividade antibacteriana contra *Prevotella nigrescens* e moderada atividade contra outras bactérias testadas. Nesse sentido, os óleos essenciais de *P. heptaphyllum* podem ser utilizados como um componente promissor de novos produtos para higiene bucal, uma vez que o

S. mutans é um dos principais agentes causadores de doenças bucais, como cárie dentária. Os óleos essenciais das folhas e frutos de *P. heptaphyllum* possuem benefícios para a saúde e podem ser valiosos e úteis no campo médico e farmacêutico da odontologia e nas indústrias farmacêutica e cosmética para a produção de enxaguantes bucais, cremes dentais e outros produtos de higiene bucal. Em conclusão, são necessários mais estudos para identificar os constituintes químicos ativos dos óleos essenciais de *P. heptaphyllum* e determinar a CIM *in vivo* e *in situ*.

Declaração de divulgação

Nenhum potencial conflito de interesses é relatado pelos autores.

Agradecimentos

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

References

- Aguiar, G.P., Carvalho, C.E., Dias, H.J., Reis, E.B., Martins, M.H.G., Wakabayashi, K.A.L., Groppo, M., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., Crotti, A.E.M. (2013). Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria. *Nat Prod Res.*, 27, 1668-1672.
- Araujo, D.A.O.V., Takayama, C., Faria, F.M., Socca, E.A.R., Dunder, R.J., Manzo, L.P., Ferreira, A.L., Brito, A.R.M.S. (2011). Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. *Rev Bras Farmacogn.*, 21, 721-729.
- Bandeira, P.N., Machado, M.I.L., Cavalcanti, F.S., Lemos, T.L.G. (2001). Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *J Essent Oil Res.*, 13, 33-34.

- Bardají, D.K.R., Reis, E.B., Medeiros, T.C.T., Lucarini, R., Crotti, A.E.M., Martins, C.H.G. (2016). Antibacterial activity of commercially available plant-derived essential oils against oral pathogenic bacteria. *Nat Prod Res.*, 30, 1178-1181.
- Benachinmardi, K.K., Nagamoti, J., Kothiwale, S., Metgud, S.C. (2015). Microbial flora in chronic periodontitis: study at a tertiary health care center from north Karnataka. *J Lab Physicians.*, 7, 49-54.
- Carneiro, N.S., Alves, C.C.F., Alves, J.M., Egea, M.B., Martins, C.H.G., Silva, T.S., Bretanha, L.C., Balleste, M.P., Micke, G.A., Silveira, E.V., Miranda, M.L.D. (2017). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzchiana* Berg (Myrtaceae). *An Acad Bras Cienc.*, 89, 1907-1915.
- Carvalho, L.E., Magalhães, L.A.M., Lima, M.P., Marques, M.O.M., Facanali, R. (2013). Essential oils of *Protium* of the Adolpho Ducke forest reserve: *Protium crassipetalum*, *P. heptaphyllum* subs. *Ulei*, *P. pilosissimum* and *P. polybotryum*. *J Essent Oil Bear Pl.*, 16, 551-554.
- De Lima, E.M., Cazelli, D.S.P., Pinto, F.E., Mazuco, R.A., Kalil, I.C., Lenz, D., Scherer, R., Andrade, T.U., Endringer, D.C. (2016). Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity. *Phcog Mag.*, 12, S42-S46.
- Franca, J.R., De Luca, M.P., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Moreira, A.N., Santos, V.R., Faraco, A.A.G. (2014). Propolis-based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complement Altern Med.*, 14, 1-11.
- Gonçalves, R., Ayres, V.F.S., Carvalho, C.E., Souza, M.G.M., Guimarães, A.C., Corrêa, G.M., Martins, C.H.G., Takeara, R., Silva, E.O., Crotti, A.E.M. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Vitex agnus-castus* L. (Lamiaceae). *An Acad Bras Cienc.*, 89, 2825-2832.
- Krzysciak, W., Jurczak, A., Koscielniak, D., Bystrowska, B., Skalniak, A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 33, 499-515.
- Melo, D.C., Miranda, M.L.D., Júnior, W.G.F., Andrade, P.M., Alcoba, A.E.T., Silva, T.S., Casal, C.M., Martins, C.H.G. (2017). Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). *Orbital: Electron J Chem.*, 9, 55-60.

- Mobin, M., De Lima, S.G., Almeida, L.T.G., Takahashi, J.P., Teles, J.B., Szeszs, M.W., Martins, M.A., Carvalho, A.A., Melhem, M.S.C. (2016). MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* species. *Rev Bras Pl Med.*, 18, 531-538.
- Mohieldin, E.A.M., Muddathir, A.M., Yamauchi, K., Mitsunaga, T. (2017). Anti-caries activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Terminalia laxiflora*. *Rev Bras Farmacogn.*, 27, 611-618.
- Murthy, K.S.R., Reddy, M.C., Rani, S.S., Pullaiah, T. (2016). Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: a review. *J Pharmacogn Phytochem.*, 5, 247-258.
- Radulović, N.S., Blagojevic, P.D., Stojanovic-Radic, Z.Z., Stojanovic, N.M. (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem.*, 20, 932-952.
- Santiago, K.B., Piana, G.M., Conti, B.J., Cardoso, E.O., Andrade, B.F.M.T., Zanutto, M.R., Rall, V.L.M., Jr, A.F., Sforcin, J.M. (2018). Microbiological control and antibacterial action of a propolis-containing mouthwash and control of dental plaque in humans. *Nat Prod Res.*, 32, 1441-1445.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2016, 3012462.
- Tardugno, R., Pellati, F., Iseppi, R., Bondi, M., Bruzzesi, G., Benvenuti, S. (2018). Phytochemical composition and *in vitro* screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Nat Prod Res.*, 32, 544-551.
- Teixeira, N.D., Parolo, C.C.F., Maltz, M., Tugnait, A., Devine, D., Do, T. (2016). *Actinomyces* spp. Gene expression in root caries lesions. *J. Oral Microbiol.*, 8, 32383.
- Tonetti, M.S., Bottenberg, P., Conrads, G., Eickholz, P., Heasman, P., Huysmans, M.C., López, R., Madianos, P., Muller, F., Needleman, I., Nyvad, B., Preshaw, P.M., Pretty, I., Renvert, S., Schwendicke, F., Trombelli, L., Van der Putten, G.J., Vanobbergen, J., West, N., Young, A., Paris, S. (2017). Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing – consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the

boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol.*, 44, S135-S144.

- Vieira, T.M., Dias, H.J., Medeiros, T.C.T., Grundmann, C.O., Groppo, M., Heleno, V.C.G., Martins, C.H.G., Cunha, W.R., Crotti, A.E.M., Silva, E.O. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* Asteraceae leaves. *J Essent Oil Bear Pl.*, 20, 123-131.
- Zhang, Y., Zhen, M., Zhan, Y., Song, Y., Zhang, Q., Wang, J. (2017). Population-genomic insights into variation in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates and its association with periodontal disease. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7, 409.

CAPÍTULO II - Composição química, efeitos leishmanicidas e citotóxicos *in vitro* de óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae)

(Artigo publicado na Revista Journal of Essential Oil Research. 2018)

RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários *Leishmania*, cujo tratamento é restrito a um número limitado de medicamentos que exibem alta toxicidade, efeitos colaterais e são geralmente caros. Neste estudo, foram avaliadas a composição química e a atividade antileishmanicida *in vitro* dos óleos essenciais de folhas de *Protium heptaphyllum* jovens (PY-EO) e folhas adultas (PA-EO) contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. PY-EO e PA-EO foram ativos contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com $CI_{50} = 9,02$ e $28,88 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os constituintes químicos de PY-EO e PA-EO foram identificados por GC-MS e GC-FID. β -cariofileno (15,1%), β -elemeno (9,4%), 1,8-cineol (8,1%), α -pineno (7,5%), óxido de cariofileno (7,1%) e limoneno (6,5%) foram os principais constituintes identificados no óleo de folhas jovens, enquanto que apenas o β -cariofileno (15,0%) e o guaiol (7,5%) foram identificados em maior concentração no óleo das folhas adultas. PY-EO e PA-EO mostraram toxicidade moderada à *Artemiasalina* pelo teste de artêmia, exibindo valores de LC_{50} de $490,50 \mu\text{g/mL}$ e $488,30 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; óleos essenciais; *Protium heptaphyllum*; toxicidade; atividade antiparasitária; influência da idade.

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* que afeta a pele, as mucosas e os órgãos internos. A leishmaniose é endêmica em 88 países, onde cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas (1). Os dados confirmam que aproximadamente dois milhões de novos casos de pessoas infectadas são relatados em todo o mundo a cada ano. A espécie *Leishmania amazonensis* é a mais frequente no Brasil, sendo um dos agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana, transmitida pela picada de um mosquito infectado (2).

O tratamento da leishmaniose consiste no uso de quimioterápicos tóxicos, como estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina e anfotericina B, que requerem administração parenteral com supervisão e atendimento médico (3). Por esse motivo, é urgente identificar novos compostos leishmanicidas mais efetivos e menos tóxicos que venham de produtos naturais, como óleos essenciais, fonte rica em metabólitos ativos (4).

Existem três tipos diferentes de manifestações clínicas da leishmaniose: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea (5). Especificamente no Brasil, essa doença está presente em 19 dos 27 estados, destacando a forma de leishmaniose visceral que apresenta maiores taxas de incidência nas regiões Nordeste e Norte do país (6).

A família Burseraceae é amplamente distribuída em áreas tropicais, apresentando cerca de 750 espécies e 190 gêneros que ocorrem na África, na Malásia e nas Américas. O gênero *Piper* (Piperaceae) contém mais de 150 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As plantas desse gênero possuem alta importância comercial, econômica e medicinal, pois produzem óleos essenciais responsáveis por aplicações tanto na área biológica e farmacêutica quanto na indústria cosmética (7). No Brasil, a espécie *Protium heptaphyllum* é conhecida como breu-branco ou almecega e seus óleos essenciais possuem diversas propriedades biológicas importantes, como anti-inflamatória, antitumoral, antileishmanicida, entre outras (8).

Com base nas considerações acima, o presente estudo teve como objetivo verificar pela primeira vez a comparação do perfil químico dos óleos essenciais extraídos das folhas jovens e adultas de *P. heptaphyllum* e suas atividades anti-*Leishmania amazonensis* e citotóxicas *in vitro*.

2. Experimental

2.1. Material Vegetal

O material vegetal foi coletado no Instituto Federal Goiano - Campus Iporá na cidade de Iporá (16°24'14,9"Sul e 51°06'40,0"Oeste), estado de Goiás, em dezembro de 2017, às 16h. A planta foi identificada pela botânica Luzia Francisca de Souza e uma excisata de *Protium heptaphyllum* (HJ1036) foi depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto.

2.2. Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *P. heptaphyllum* foram extraídos de folhas jovens e adultas por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger por 2 h. A hidrodestilação foi realizada em triplicata. O material vegetal foi dividido em três amostras de 500 g cada, e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta dos óleos essenciais (OEs), os traços de água remanescentes no óleo foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. O PY-EO e o PA-EO foram armazenados em vidro de cor âmbar e mantidos em geladeira a 4°C até a análise. Os rendimentos (m/m) foram calculados a partir do peso de folha e expressados como a média da análise em triplicata.

2.3. CG-FID e análise de CG-MS

PY-EO e PA-EO foram dissolvidos em hexano e analisados cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) e as análises foram realizadas nos sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna usada no CG-FID foi programada para subir de 60 para 240 °C a 3 °C/min e depois foi mantida a 240 °C por 5 minutos; o gás transportador era H₂ a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O equipamento foi configurado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µL (proporção de divisão de 1:10) e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280 °C, respectivamente. As concentrações relativas dos componentes foram obtidas normalizando as áreas dos picos (%). As áreas relativas foram a média das análises CG-FID em triplicata. As condições do CG-MS e a identificação de PY-EO e PA-EO foram relatadas anteriormente (9). A identificação dos componentes voláteis de PY-EO e PA-EO (Tabela 1) foi baseada em

seus índices de retenção em uma coluna capilar OPTIMA-5 (30 m x 0,25 mm; 0,250 µm) nas mesmas condições operacionais usadas para o CG em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₀); as estruturas foram comparadas por computador com NIST/EPA/NIH, e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (10).

2.4. Atividade antileishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Para avaliar a atividade antileishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/ BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Posteriormente, cerca de 1×10^6 parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços e os óleos essenciais previamente dissolvidos em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO, solução-mãe 100 mM) (Synth) foram adicionados às culturas a concentrações de 3,12 a 50 µg/mL. Anfotericina B (Sigma Aldrich, 97% de pureza) em concentrações variando de 0,19 a 0,011 µg/mL foi adicionada às culturas e usada como controle positivo. As culturas foram incubadas em uma incubadora de DBO (Quimis) a 25 °C por 24 h, e a atividade antileishmanicida foi determinada verificando se o crescimento das formas promastigotas foi inibido, conforme revelado pela contagem do número total de promastigotas vivas na câmara de Neubauer (Global Glass - Porto Alegre, BR) com base na motilidade flagelar. Foi utilizado o meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1% de DMSO (Synth) (concentração mais alta). Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle negativo (0,1% DMSO). As experiências foram realizadas em triplicata. A determinação dos valores de concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi realizada por curvas de regressão não linear de um software Windows GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad software, EUA).

2.5. Teste de letalidade para artêmia

O ensaio foi realizado de acordo com Meyer et al. (1982) (11). Ovos de larva de *Artemia salina* foram cultivados em água do mar artificial: NaCl 24,0 g/L, CaCl₂. 2H₂O 1,5 g/L, KBr 0,1 g/L, KCl 0,7 g/L, Na₂SO₄ 4,0 g/L, NaHCO₃ 0,3 g/L, MgCl₂. 6H₂O 11,0 g/L. PY-EO e PA-EO foram dissolvidos em Tween 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) (1:2, v/v) e depois em água do mar artificial. Dez artêmias (*A. salina*) foram

transferidas para tubos de ensaio contendo as seguintes concentrações dos óleos essenciais: 0,5, 1, 5, 10 e 50 µg/mL ($n=4$). Os tubos foram mantidos em iluminação constante e o timol foi usado como controle padrão. Os náuplios vivos foram contados após 24 horas de exposição aos óleos. Os intervalos de confiança de LC₅₀ e 95% foram das contagens de 24 horas, usando o método de análise probit (12). O volume final utilizado da solução de Tween 80 e DMSO (1:2, v/v) também foi testado.

3. Resultados e discussão

Os óleos essenciais (PY-EO e PA-EO) obtidos por hidrodestilação têm uma cor amarela clara com um cheiro muito agradável. Os rendimentos de extração foram avaliados em 1,2 e 1,0% para PY-EO e PA-EO, respectivamente.

3.1. Identificação dos componentes

A Tabela 1 mostra os resultados da análise CG-MS e CG-FID que identificaram 28 e 24 compostos voláteis para o PY-EO e PA-EO, respectivamente. Os óleos essenciais das folhas de *P. heptaphyllum* (1,2%; jovens e 1,0%; adulto) produziram valor superior ao percentual encontrado anteriormente por Pontes et al. (2007) em um estudo desenvolvido com a mesma espécie (13). No PY-EO, os principais constituintes identificados foram β-cariofileno (15,1%, **1**), β-elemeno (9,4%, **2**), 1,8-cineol (8,1%, **3**), α-pineno (7,5%, **4**), óxido de cariofileno (7,1%, **5**) e limoneno (6,5%, **6**). Entretanto, os dois constituintes majoritários foram identificados no PA-EO, sendo eles o β-cariofileno (15,0%) e o guaiol (7,5%, **7**), totalizando 90,6 e 91,0% da composição química do PY-EO e PA-EO, respectivamente (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de folhas de *P. heptaphyllum* de acordo com a idade das folhas.

<i>Componentes</i>	<i>IR_{exp}</i>	<i>IR_{lit}</i>	<i>AR%</i>	
			<i>PY-EO</i>	<i>PA-EO</i>
α-Pineno	930	932	7,5	2,2
Mirceno	987	988	5,4	4,6
δ -3-careno	1006	1008	1,9	1,6
Limoneno	1022	1024	6,5	5,6
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1030	1032	0,1	-
1, 8-cineol	1033	1033	8,1	5,0
Terpinen-4-ol	1172	1174	0,1	4,1
<i>p</i> -cimen-8-ol	1176	1179	0,1	-
α -terpineol	1186	1186	0,2	2,2
(<i>E</i>)-carveol	1214	1215	0,1	-
α -cubebeno	1344	1345	0,5	1,5
α -copaeno	1374	1374	0,1	2,1
β-Elemeno	1388	1389	9,4	1,5
β-Cariofileno	1407	1408	15,1	15,0
α -humuleno	1451	1452	2,3	2,7
γ -gurjuneno	1475	1475	1,3	-
<i>cis</i> - β -guaieeno	1492	1492	4,5	3,4
α -muuroleno	1499	1500	0,3	2,3
Acifileno	1501	1501	1,9	3,0
β -bisaboleno	1504	1505	1,7	5,1
δ -cadineno	1513	1513	3,4	3,7
α -calacoreno	1548	1549	0,2	1,2
Ledol	1561	1562	4,4	4,5
Espatulenol	1576	1577	4,5	4,7
Óxido de cariofileno	1581	1582	7,1	1,7
Rosifoliol	1592	1592	1,3	3,8
Guaiol	1600	1600	0,1	7,5
Epóxido de humuleno II	1608	1606	2,5	2,0
Total			90,6	91,0

PY-EO: Óleo essencial de folhas jovens; *PA-EO*: Óleo essencial de folhas adultas; *IR_{exp}*: Índice de retenção determinado em relação aos *n*-alcanos (C₈-C₂₀) na coluna OPTIMA-5 (30 m X 0,25 mm; 0,250 μ m); *IR_{lit}*: Índice de retenção da literatura (10); *AR%*: área relativa (área do pico em relação à área total do pico no cromatograma GC-FID).

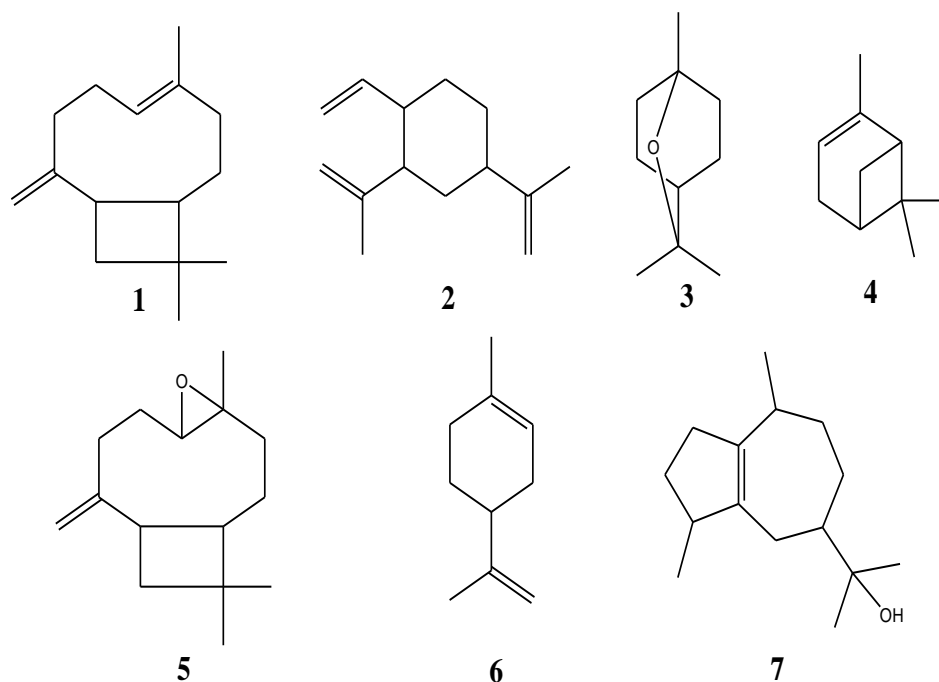


Figura 1. Estruturas químicas dos sete principais constituintes identificados no óleo essencial de folhas jovens de *P. heptaphyllum*: β -cariofileno (1), β -elemeno (2), 1,8-cineol (3), α -pineno (4), óxido de cariofileno (5) e limoneno (6). Os principais constituintes do óleo essencial das folhas adultas foram apenas o β -cariofileno (1) e o guaiol (7).

Na literatura, estudos anteriores de óleos essenciais de outras espécies do gênero *Protium* mostraram composição química semelhante à encontrada neste estudo. Por exemplo, os terpenos α -pineno, óxido de cariofileno, limoneno e β -cariofileno foram identificados como o principal componente do óleo essencial das espécies *P. bahianum*, *P. hebetatum* e *P. decandrum* (14-16). Ambos os compostos 1,8-cineol e guaiol também foram encontrados anteriormente no óleo essencial extraído de *P. heptaphyllum*, cultivado no Brasil e na Colômbia (17, 18).

Vale ressaltar que, comparando a composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas jovens e adultas de *P. heptaphyllum*, notou-se que o óleo essencial de folhas jovens apresentou maior diversidade e concentração desses compostos (Tabela 1). É descrito na literatura que, considerando as mesmas espécies vegetais, as diferenças observadas em relação à composição química e à concentração dos constituintes químicos no óleo essencial deste podem ocorrer devido aos quimiotipos. Acima de tudo, essas diferenças podem estar associadas a interações entre plantas (plantas, microrganismos, insetos), diferenças nas condições ambientais de cultivo, tempo, tempo de coleta, idade e estágio de desenvolvimento da planta (19).

3.2. Atividades antileishmanicida e citotóxica

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida de PY-EO e PA-EO contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade leishmanicida dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *Protium heptaphyllum* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Amostras	% de lise \pm S.D/Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	50	25	12,5	6,25	3,12	
Folhas adultas	93,16 \pm 0,00	32,54 \pm 0,00	16,00 \pm 0,00	9,06 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	28,88 \pm 3,59
Folhas jovens	100 \pm 0,00	79,17 \pm 23,17	58,10 \pm 3,23	31,85 \pm 5,25	28,34 \pm 6,90	9,02 \pm 1,34
	0,19	0,095	0,047	0,023	0,011	
Anfotericina B	99,88 \pm 0,60	78,33 \pm 24,43	68,74 \pm 21,97	54,67 \pm 17,77	42,44 \pm 20,97	0,011 \pm 0,34

Controle positivo: Anfotericina B; **Controle negativo:** Meio RPMI + 0,1%

Os valores de CI₅₀ de 9,02 e 28,88 $\mu\text{g/mL}$ são considerados muito promissores em comparação com a da anfotericina B (CI₅₀ = 0,011 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 2). Em relação à atividade leishmanicida (valores de CI₅₀), a literatura descreve que amostras com CI₅₀ < 10 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas altamente ativas, CI₅₀ > 10 < 50 $\mu\text{g/mL}$ ativas, CI₅₀ > 50 < 100 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente ativas e CI₅₀ > 100 $\mu\text{g/mL}$ inativas (20).

O óleo essencial das folhas jovens de *P. heptaphyllum* foi considerado altamente ativo contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, enquanto o óleo extraído das folhas adultas foi classificado como ativo. Essa variabilidade na atividade antileishmanicida pode ser explicada pelas diferenças qualitativas e quantitativas nas composições químicas de cada PY-EO e PA-EO. Assim, os principais compostos de PY-EO e PA-EO das folhas foram β -cariofileno (15,1%), β -elemeno (9,4%), 1,8-cineol (8,1%), α -pineno, guaiol (7,5%), óxido de cariofileno (7,1%) e limoneno (6,5%), que, quando testados contra parasitas do gênero *Leishmania*, apresentaram atividade satisfatória (21-25). Cabe ressaltar que no PA-EO apenas os constituintes β -cariofileno (15,0%) e guaiol (7,5%) foram identificados em maior quantidade, fato que pode justificar seu maior valor de CI₅₀, ou seja, menor ação contra parasitas.

O ensaio contra formas promastigotas do gênero *Leishmania* é uma triagem preliminar para identificar novos compostos antileishmanicidas promissores. O uso do ensaio nas formas de promastigotas é consideravelmente mais fácil e mais barato que nas amastigotas e possibilita o desenvolvimento de pesquisas em países com áreas endêmicas, como o Brasil, onde os recursos costumam ser limitados (26). Os compostos dos óleos essenciais podem causar alterações no potencial da membrana mitocondrial, modificação do índice redox, inibição da biossíntese de isoprenoides celulares e alterações na membrana plasmática, o que pode explicar sua atividade antileishmanicida (4).

Em relação à atividade citotóxica, o PY-EO e o PA-EO apresentaram toxicidade moderada contra *Artemia salina* com LC₅₀ 490,50 (339,5-720,8 - intervalo de confiança %) µg/mL e 488,30 (329,7-690,0 - intervalo de confiança %) µg/mL, respectivamente (Tabela 3). Os valores de LC₅₀ obtidos para PY-EO e PA-EO foram relativamente inferiores aos obtidos para timol (LC₅₀ 500,40 µg/mL), que foi usado como substância de referência. De acordo com Roldos et al. (2008), concentrações com toxicidade abaixo de 1000 µg/mL podem ser viáveis para ensaios *in vitro* e *in vivo* para atividades biológicas (27). De acordo com nossos dados, vários trabalhos indicam que o timol apresentou diversas atividades biológicas, como citotoxicidade, propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antiespasmódicas, antibacterianas, antifúngicas, antissépticas e antitumorais (28).

Tabela 3. Toxicidade *in vitro* dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *Protium heptaphyllum* contra *Artemia salina*.

Amostras	Concentrações em µg/mL	LC ₅₀ em µg/mL	Intervalo de confiança 95%
PY-EO	0,5-50	490,50	339,5-720,8
PA-EO	0,5-50	488,30	329,7-690,0
Timol*	10-1000	500,40	347,8-783,5

PY-EO: Óleo essencial de folhas jovens; PA-EO: Óleo essencial de folhas adultas; *Substância de referência

Uma quantidade crescente de evidências aponta o teste de *A. salina* como crucial para o efeito antiproliferativo de muitos produtos naturais (29). Segundo Ferraz Filha et al. (2011), amostras brutas com valores de LC₅₀ inferiores a 100 µg/mL são consideradas altamente tóxicas, aquelas com valores de LC₅₀ entre 100 µg/mL e 500 µg/mL, moderadamente tóxicas, aquelas com valores de LC₅₀ entre 500 µg/mL e 1000

$\mu\text{g/mL}$, levemente tóxicas, e aquelas com valores de LC_{50} acima de $1000 \mu\text{g/mL}$ são consideradas não tóxicas (30).

Em resumo, a forte atividade anti-*Leishmania amazonensis* e citotoxicidade observadas para o PY-EO e PA-EO podem ser explicadas pelo fato de que a maior parte do óleo essencial contém um grande número de compostos que não possuem alvos celulares específicos. Os óleos essenciais têm caráter não polar e podem atravessar facilmente as paredes celulares e membranas citoplasmáticas. Assim, componentes do óleo essencial atravessam a membrana, fazem com que o citoplasma coagule, desnature proteínas, atrapalhe as vias metabólicas, como a biossíntese de vários lipídios, e acabe levando à morte celular por necrose e apoptose (31).

4. Conclusão

Os resultados do presente estudo foram satisfatórios para discriminar as diferenças na composição química de PY-EO e PA-EO em função da idade das folhas. Esta pesquisa também revelou uma atividade biológica significativa de PY-EO e PA-EO contra as promastigotas de *Leishmania amazonensis*, exibindo também, ambos os óleos, citotoxicidade moderada em relação ao teste com *Artemia salina*. Os presentes resultados indicam que os óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *P. heptaphyllum*, principalmente o óleo de folhas jovens, apresentam potencial para o desenvolvimento de um medicamento novo e mais seguro, com menos efeitos colaterais no tratamento da leishmaniose. Em suma, são necessários mais estudos *in vivo* para investigar os compostos subjacentes à ação antileishmanicida e citotóxica de PY-EO e PA-EO e seus mecanismos celulares envolvidos nessas atividades.

5. Agradecimentos

Os autores são gratos à CAPES, ao CNPq, à FAPEG e ao IFGOIANO pelo apoio financeiro.

6. Referências

1. D.C. Ayres, M.C. Marcucci and S. Giorgio, Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 102, 215-220 (2007).
2. C.N. Dias, K.A.F. Rodrigues, F.A.A. Carvalho, S.M.P. Carneiro, J.G.S. Maia, E.H.A. Andrade and D.F.C. Moraes, Molluscicidal and leishmanicidal activity of the

leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. *Chem. Biodivers.* 10, 1133-1140 (2013).

3. L.M.R. Antinarelli, N.C. Pinto, E. Scio and E.S. Coimbra, Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 733-742 (2015).

4. Y. Tariku, A. Hymete, A. Hailu and J. Rohloff, *In vitro* evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chem. Biodivers.* 8, 614-623 (2011).

5. M. Machado, G. Santoro, M.C. Sousa, L. Salgueiro and C. Cavaleiro, Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour Fragr. J.* 25, 156-160 (2010).

6. M.M. Bastos, N. Boechat, L.V.B. Hoelz and A.P. de Oliveira, Quimioterapia antileishmania: uma revisão da literatura. *Rev. Virtual Quim.* 8, 2072-2104 (2016).

7. L.R. Souza, F.G. Trindade, R.A. de Oliveira, L.C.B. Costa, V.M. Gomes and M. Cunha, Histochemical characterization of secretory ducts and essential oil analysis of *Protium* species (Burseraceae). *J. Essent. Oil Res.* 28, 166-171 (2015).

8. G. Marquina-Chidsey, B. Monro, I. Velázquez, D. Arias, E. Pérez, D.T. Santos and M. Vargas, Evaluation of supercritical fluid extraction of tacamahaco (*Protium heptaphyllum*) resin. *J. Essent. Oil Res.* 29, 433-450 (2017).

9. E.C.C. Costa, M. Christofoli, G.C.S. Costa, M.F. Peixoto, J.B. Fernandes, M.R. Forim, K.C. Pereira, F.G. Silva and C.M. Casal, Essential oil repellent action of plants of the genus *Zanthoxylum* against *Bemisia tabaci* biotype B (Homoptera: Aleyrodidae). *Sci. Hort.* 226, 327-332 (2017).

10. R.P. Adams, Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Pub. Corp (2007).

11. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin, Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31-34 (1982).

12. J.T. Litchfield and F. Wilcoxon, A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113 (1949).

13. W.J.T. Pontes, J.C.G. de Oliveira, C.A.G. da Câmara, A.C.H.R. Lopes, M.G.C.G. Júnior, J.V. de Oliveira, R. Barros and M.O.E. Schwartz, Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amaz.* 37, 103-110 (2007).

14. M.G.B. Zoghbi, E.H.A. Andrade, M.P. Lima, T.M.D. Silva and D.C. Daly, The essential oils of five species of *Protium* growing in the North of Brazil. *J. Essent Oil Bearing Plants* 8, 312-317 (2005).
15. M.M. de Moraes, C.A.G. da Camara and C.S. Ramos, Seasonal variation in the essential oil of *Protium bahianum* Daly (*Burseraceae*). *J. Essent Oil Bearing Plants* 16, 300-307 (2013).
16. D.S. Pinto, L.E. de Carvalho, M.P. Lima, M.O.M. Marques, R. Facanali and J.E.L.S. Ribeiro, Volatiles of foliar rachis, branches and resin elicited by insects from *Protium hebetatum* grows wild in Amazon. *J. Essent Oil Bearing Plants* 13, 699-703 (2010).
17. D.D. Marques, R.A. Sartori, T.L.G. Lemos, L.L. Machado, J.S.N. de Souza and F.J.Q. Monte, Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amaz.* 40, 227-230 (2010).
18. G. Tafurt-García and A. Muñoz-Acevedo, Metabolitos volátiles presentes en *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Colectado en Tame (Arauca-Colombia). *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat* 11, 223-232 (2012).
19. J.A. Santiago, M.G. Cardoso, L.R. Batista, E.M. Castro, M.L. Teixeira and M.F. Pires, Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. *Acta. Sci. Biol. Sci.* 38, 139-147 (2016).
20. J.P.S. de Lima, M.L.B. Pinheiro, A.M.G. Santos, J.L.S. Pereira, D.M.F. Santos, A. Barison, I. Silva-Jardim and E.V. Costa, *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.* 4, 692-702 (2012).
21. A. Hamdi, J. Bero, C. Beaufay, G. Flamini, Z. Marzouk, Y.V. Heyden and J. Quetin-Leclercq, *In vitro* antileishmanial and cytotoxicity activities of essential oils from *Haplophyllum tuberculatum* A. Juss leaves, stems and aerial parts. *Complement. Altern. Med.* 18, 60 (2018).
22. K.A.F. Rodrigues, L.V. Amorim, J.M.G. de Oliveira, C.N. Dias, D.F.C. Moraes, E.H.A. Andrade, J.G.S. Maia, S.M.P. Carneiro and F.A.A. Carvalho, *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agente: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2013, 279726 (2013).
23. T.M. Capello, E.G.A. Martins, C.F. de Farias, C.R. Figueiredo, A.L. Matsuo, L.F.D. Passero, D. Oliveira-Silva, P. Sartorelli and J.H. Lago, Chemical composition

and *in vitro* cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. Nat. Prod. Commun. 10, 285-288 (2015).

24. L. Monzote, G. Geroldinger, M. Tonner, R. Scull, S. de Sarkar, S. Bergmann, M. Bacher, K. Staniek, M. Chatterjee, T. Rosenau and L. Gille, Interaction of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. with mitochondria in *Leishmania* and others eukaryotes. Phytother. Res. 32, 1729-1740 (2018).

25. M.C.F. Garcia, D.C. Soares, R.C. Santana, E.M. Saraiva, A.C. Siani, M.F.S. Ramos, M.G.M. Danelli, T.C. Souto-Padron and L.H. Pinto-da-Silva, The *in vitro* antileishmanial activity of essential oils from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. Parasitology 145, 1219-1227 (2018).

26. J.L. Siqueira-Neto, O.R. Song, H. Oh, J.H. Sohn, G. Yang, J. Nam, J. Jang, J. Cechetto, C.B. Lee, S. Moon, A. Genovesio, E. Chatelain, T. Christophe and L.H. Freitas-Junior, Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. Plos Negl. Trop. Dis. 4, e675 (2010).

27. V. Roldos, H. Nakayama, M. Rolón, A. Monteiro-Torres, F. Trucco, S. Torres, C. Veja, Y.M. Ponce, V. Heguaburu, G. Yaluff, A. Gómez-Barrio, L. Sanabria, M.E. Ferreira, A.R. de Arias and E. Pandolfi, Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *in silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. Eur. J. Med. Chem. 43, 1797-1807 (2008).

28. M.F.N. Meeran, H. Javed, H.A. Tae, S. Azimullah and S.K. Ojha, Pharmacological properties and molecular mechanism of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. Front. Pharmacol. 8, 380 (2017).

29. L.P. Santos Pimenta, G.B. Pinto, J.A. Takahashi, L.G.F. e Silva and M.A.D. Boaventura, Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp test). Phytomedicine 10, 209-212 (2003).

30. Z.S. Ferraz-Filha, J.A. Lombardi, L.S. Guzzo, D.A. Saúde-Guimarães, Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. Rev. Bras. Pl. Med. 14, 358-361 (2012).

31. J.S. Raut and S.M. Karuppayil, A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind. Crops Prod. 62, 250-264 (2014).

CONCLUSÃO GERAL

Com a pesquisa desenvolvida, verificou-se um rendimento de OE das folhas jovens e adultas com teor de 1,2 e 1,0% respectivamente e a composição química do óleo essencial das folhas jovens e adultas foi verificada através de análises de CG/MS e CG/FID identificou os seguintes compostos: β -cariofileno (15,1%), β -elemeno (9,4%), 1,8-cineol (8,1%), α -pireno (7,5%), óxido de cariofileno (7,1%) e limoneno (6,5%). Os constituintes majoritários identificados foram: β -cariofileno e guaiol, totalizando 90,6 e 91,0% da composição química.

Foram identificados nos frutos verdes e maduros os compostos: mirceno (59,0%), germacreno D (10,6%), α -cadinol (8,8%) e β -elemeno (8,2%). O OE dos frutos maduros é composto principalmente por: mirceno (31,2%), limoneno (12,9%), trans-nerolidol (9,8%) e espatulenol (7,8%).

Em relação à atividade leishmanicida do OE das folhas jovens e adultas, pode-se considerar ativo o resultado em relação ao OE das folhas adultas, para atividade citotóxica ambas possuíram atividade moderada contra *Artemia salina* em relação ao timol que foi usado como referência. Houve forte atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* utilizando os frutos verdes e maduros que apresentaram atividade contra *Prevotella nigrescens*.

O óleo essencial extraído das folhas jovens e adultas, frutos verdes e maduros, possuem atividade tanto leishmanicida e antibactericida, sendo promissor seu uso no tratamento de doenças relacionadas às espécies utilizadas nos ensaios da pesquisa, como também em outras espécies de bactérias, fungos dentre outros.