

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

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, VARIAÇÃO
SAZONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cardiopetalum calophyllum*.

Autor: Marcelo Nogueira Xavier
Orientadora: Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves

Rio Verde – GO
julho – 2015

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

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, VARIAÇÃO
SAZONAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Cardiopetalum calophyllum*.

Autor: Marcelo Nogueira Xavier
Orientadora: Dr.^a Cássia Cristina
Fernandes Alves

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

Rio Verde – GO
julho – 2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
Elaborada por Izaura Ferreira Neta - Bibliotecária CRB1-2771**

X18e Xavier, Marcelo Nogueira.

Estudo da composição química, variação sazonal e atividade biológica do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* / Marcelo Nogueira Xavier - 2015.
90f. : figs, tabs.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cássia Cristina Fernandes Alves.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2015.

Biografia.

Inclui índice de tabelas e figuras.

1. *Cardiopetalum calophyllum*. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Óleo essencial. I. Título. II. Autor. III. Orientador. IV. Coorientador.

CDU: 633.88

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser infinitamente bom e justo.

À minha família, que mesmo não entendendo bem o que faço sempre me apoiou e pela qual serei eternamente grato.

À minha mãe Márcia Camargo, por tornar esse sonho possível.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves, pelo apoio, ensinamentos, dedicação, por seu exemplo de profissionalismo e competência e pela amizade.

À Prof.^a Dr.^a Cristiane de Melo Cazal, por toda colaboração ao longo dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. José Milton Alves, pelo apoio e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, da Universidade Federal de São Carlos, por nos receber em seu laboratório para análises cromatográficas.

Ao Odirlei Simões, pela imprescindível ajuda na identificação da espécie e registro da exsicata.

À Prof.^a Dr.^a Viviane Esperandim Sampaio da Universidade de Franca, pela imprescindível ajuda nos testes citotóxicos e tripanocidas.

Aos meus amigos e companheiros de bancada do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Elizabeth, Juliana, Nargella e Elisângela.

Aos alunos de Iniciação Científica, por toda ajuda recebida Sayonara e Nathalia.

Aos colegas de curso, pelas tardes, noites e madrugadas que passamos juntos.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agroquímica, pela dedicação, 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.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural de Espinosa-MG, filho de Levi Xavier da Silva e Márcia Aparecida Nogueira Camargo, Marcelo Nogueira Xavier nasceu em 27 de janeiro de 1987. Em 2007 iniciou a sua vida acadêmica, graduando em 2011 como bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Doenças Infecto-parasitárias, ainda em 2007 começou a atuar como professor na rede estadual de ensino em Minas Gerais, atuando como professor de Ciências/Biologia e Química. Em 2013 iniciou no curso de pós-graduação em Agroquímica no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	01
ABSTRACT	03
1. INTRODUÇÃO	05
1.1 Família Annonaceae	05
1.2 <i>Cardiopetalum calophyllum</i>	07
1.3 Metabolismo especial e óleos essenciais	08
1.4 Aplicações dos óleos essenciais	10
1.5 <i>Trypanosoma cruzi</i> e atividade tripanocida	11
1.6 Citotoxicidade dos óleos essenciais	13
1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
OBJETIVOS	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
CAPÍTULO I: Composição química do óleo volátil de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletada em área de Cerrado	25
RESUMO	25
CHAPTER I: Chemical composition of the volatile oil of <i>Cardiopetalum</i>	

<i>calophyllum</i> collected in Cerrado área	27
ABSTRACT	27
1.1. INTRODUÇÃO	29
1.2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
1.2.1. Material vegetal	30
1.2.2. Obtenção do óleo volátil	30
1.2.3. Identificação de metabólitos especiais	30
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1.4. CONCLUSÃO	34
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO II: Teor e composição química do óleo essencial de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> em função da sazonalidade	39
RESUMO	39
CHAPTER II: Content and composition of essential oil of Chemical <i>Cardiopetalum calophyllum</i> in seasonality of function	40
ABSTRACT	40
2.1. INTRODUÇÃO	42
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.2.1 Local e condições climáticas do experimento	43
2.2.2 Coleta e preparo das amostras	44
2.2.3. Extração do óleo essencial	44
2.2.4 Teor do óleo essencial	44
2.2.5 Composição química do óleo essencial	44
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.4. CONCLUSÃO	52
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO III: Atividade tripanocida e citotóxica do óleo essencial de <i>Cardiopetalum calophyllum</i>	57
RESUMO	57
CHAPTER III: Trypanocide and cytotoxic activity of the essential oil of <i>Cardiopetalum calophyllum</i>	58
ABSTRACT	58
3.1. INTRODUÇÃO	59

3.2. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.2.1. Óleos essenciais	61
3.2.2. Obtenção do material vegetal	61
3.2.3. Extração do óleo essencial	61
3.2.4. Avaliação da atividade citotóxica	61
3.2.5. Parasita	62
3.2.6. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> com sangue infectado	62
3.2.7. Análise estatística	63
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.3.1. Atividade tripanocida	63
3.3.2. Atividade citotóxica	64
3.4. CONCLUSÕES	65
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CONCLUSÕES GERAIS	70
APÊNDICE A	72
APÊNDICE B.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 01	
Tabela 1: Compostos presentes no óleo essencial de folhas, flores e frutos de <i>C. calophyllum</i> , coletados em área típica de Cerrado, na cidade de Rio Verde-GO no ano de 2014.....	32
CAPÍTULO 02	
Tabela 1: Dados mensais de temperatura média, precipitação e umidade relativa do ar em Rio Verde, no período de março de 2014 a janeiro de 2015...	43
Tabela 2: Composição química do óleo essencial de folhas de <i>C. calophyllum</i> coletadas em área típica de Cerrado, na cidade de Rio Verde-GO, em diferentes épocas (março/14 a janeiro/15).....	50
CAPÍTULO 03	
Tabela 1: Atividade tripanocida do óleo essencial de <i>C. calophyllum</i> extraído de folhas, flores e frutos sobre a forma tripomastigota.....	63
Tabela 2: Atividade citotóxica do óleo essencial de <i>C. calophyllum</i> extraído de folhas, flores e frutos sobre fibroblastos.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Figura 1: Indivíduo de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> (A). Ramo de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> com flores (B). Ramo de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> com frutos (C). Frutos de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> (D).....	07
Figura 2: Biossíntese simplificada de terpenos, via mevalonato.....	09
Figura 3: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos especiais em plantas.....	10
Figura 4: Forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> , agente etiológico da doença de Chagas.....	12
Figura 5: Estrutura química do Timol e Carvacrol, terpenos com atividade tripanocida.....	13
CAPÍTULO I	
Figura 1: Estrutura química dos constituintes majoritários do óleo essencial de folhas, flores e frutos de <i>C. calophyllum</i>	31
CAPÍTULO II	
Figura 1: Teores médios de óleo essencial (%) na biomassa <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> , em função da sazonalidade.....	46

APÊNDICE A

Figura 1A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em março/2014.....	72
Figura 2A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em abril/2014.....	72
Figura 3A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em maio/2014.....	72
Figura 4A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em junho/2014.....	73
Figura 5A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em julho/2014.....	73
Figura 6A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em agosto/2014.....	73
Figura 7A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em setembro/2014.....	74
Figura 8A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em outubro/2014.....	74
Figura 9A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em novembro/2014.....	74
Figura 10A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em dezembro/2014.....	75
Figura 11A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em janeiro/2015.....	75

APÊNDICE B

Figura 1B: Cromatograma do óleo essencial de flores de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em setembro/2014.....	75
Figura 2B: Cromatograma do óleo essencial de frutos de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletados em dezembro/2014.....	76
Figura 3B: Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em março/2014.....	76

ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE A	72
Figura 1A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em março/2014.....	72
Figura 2A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em abril/2014.....	72
Figura 3A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em maio/2014.....	72
Figura 4A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em junho/2014.....	73
Figura 5A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em julho/2014.....	73
Figura 6A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em agosto/2014.....	73
Figura 7A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em setembro/2014.....	74
Figura 8A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em outubro/2014.....	74

Figura 9A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em novembro/2014.....	74
Figura 10A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em dezembro/2014.....	75
Figura 11A: Cromatograma do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em janeiro/2015.....	75
APÊNDICE B.....	75
Figura 1B: Cromatograma do óleo essencial de flores de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em setembro/2014.....	75
Figura 2B: Cromatograma do óleo essencial de frutos de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletados em dezembro/2014.....	76
Figura 3B: Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>Cardiopetalum calophyllum</i> coletadas em março/2014.....	76

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

ISO	International Standard Organization
IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
IR	Índice de retenção
UniRV	Universidade de Rio Verde
UNIMONTES	Universidade Estadual de Montes Claros
UR	Umidade relativa do ar
CG-EM	Cromatógrafo a gás acoplado a espectômetro de massas
S/L	Sem Leitura
N	Norte
S	Sul
L	Leste
O	Oeste
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
LLCMK₂	Linhagem de fibroblastos
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
VERO	Fibroblastos de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)

RESUMO

XAVIER, MARCELO NOGUEIRA. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, campus Rio Verde – GO, julho de 2015. Variação sazonal da composição química e atividade biológica do óleo essencial da *Cardiopetalum calophyllum*.

Orientadora: Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves.

Coorientadora: Dr.^a Cristiane de Melo Cazal.

Objetivou-se neste estudo determinar a composição química do óleo essencial extraído de folhas, flores e frutos de *Cardiopetalum calophyllum* e a atividade tripanocida, além da influência da sazonalidade sobre o teor e a composição química do óleo essencial de folhas. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando um aparelho de clewenger e a identificação dos constituintes pela análise em CG-EM. A atividade tripanocida foi avaliada sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, através da análise da porcentagem de lise parasitária e a atividade citotóxica foi avaliada sobre fibroblastos e determinada pelo método do MTT. Os teores de óleo essencial apresentaram diferenças significativas entre as épocas, tendo maior produção no período de setembro/14 a janeiro/15. Nas análises cromatográficas, foram identificados os sesquiterpenos espatulenol e viridiflorol como constituintes majoritários do óleo essencial das folhas, os sesquiterpenos germacreno-D e

germacreno-B no óleo essencial das flores e os sesquiterpenos hidrocarbonados germacreno-D, germacreno-B e oxigenado espatulenol no óleo essencial extraído dos frutos. A proporção relativa dos compostos no óleo essencial de folhas variou de acordo a sazonalidade. Os compostos majoritários espatulenol, viridiflorol e germacreno-D, apresentaram maiores teores relativos nos meses de março/14 (28,78%), junho/14 (10,93%) e outubro/14 (15,6%) respectivamente. As diferenças observadas ocorrem possivelmente em função da variação climática, precipitação e do estágio fenológico de *C. calophyllum*. Os óleos essenciais de folhas, flores e frutos apresentaram moderada atividade tripanocida, com $IC_{50} = 59,95; 48,75$ e $132,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ e citotoxicidade menor que o benzonidazol, com $CC_{50} = 698,3; 220,3$ e $150,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A eficácia do óleo essencial de flores e folhas foi considerada moderada no combate ao *T. cruzi*. Este trabalho descreve pela primeira vez a composição química do óleo essencial de folhas, flores e frutos da *C. calophyllum*, contribuindo significativamente para o conhecimento químico da espécie e a sua atividade biológica contra o agente causador da doença de Chagas.

PALAVRAS-CHAVES: *Cardiopetalum calophyllum*, óleo essencial, variação sazonal, *Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade.

ABSTRACT

XAVIER, MARCELO NOGUEIRA. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, campus Rio Verde – GO, July of 2015. Seasonal variation of chemical composition and biological activity of essential oil of *Cardiopetalum calophyllum*.

Adviser: Dsc Cássia Cristina Fernandes Alves.

Co-Adviser: Dsc Cristiane de Melo Cazal.

The aim of this study was to determine the chemical composition of the essential oil extracted from leaves, flowers and fruits of *Cardiopetalum calophyllum* and trypanocidal activity, beyond the influence of seasonality on content and the chemical composition of the essential oil of leaves. The essential oils extraction was performed using a technique of hydrodistillation clevenger apparatus and identification of constituents by GC-MS analysis. The trypanocidal activity was evaluated on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, analyzing the percentage of parasitic lysis and the cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts and determined by the MTT method. The essential oil content showed significant differences between the seasons, with higher production from September/14 to January/15. In the chromatographic analysis, spathulenol sesquiterpenes and viridiflorol were identified as major constituents of the essential oil from leaves, the germacrene-D sesquiterpenes and

germacrene-B in the essential oil of flowers and hydrocarbon sesquiterpenes germacrene-D, germacrene-B and oxygenated spathulenol in essential oil key extracted from the fruit. The relative proportion of the compounds in the essential oil of leaves varied according seasonality. The major compounds spathulenol, viridiflorol and germacrene-D, showed higher level in the months of March/14 (28.78%), June/14 (10.93%) and October/14 (15.6%) respectively. The differences possibly occur due to climate change, rainfall and phenological stage of *C. calophyllum*. The essential oils from leaves, flowers and fruits showed moderate trypanocidal activity with $IC_{50} = 59.95; 48.75$ and $132.61 \mu\text{g mL}^{-1}$ and less cytotoxicity than benzonidazole with $CC_{50} = 698.3; 220.3$ and $150.9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The effectiveness of the essential oil of flowers and leaves was considered moderate in the fight against *T. cruzi*. This paper describes for the first time the essential oil chemical composition of leaves, flowers and fruits of *C. calophyllum*, contributing significantly to the chemical knowledge of the species and its biological activity against the causative agent of Chagas disease.

KEY WORDS: *Cardiopetalum calophyllum*, essential oil, seasonal variation, *Trypanosoma cruzi*, cytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae possui distribuição pantropical, sendo a América do Sul um dos principais centros da diversidade desse grupo, ao lado da América Central, Ásia e África (KRINSKI et al., 2014). O Brasil abriga cerca de 386 espécies de anonáceas distribuídas em 29 gêneros por todo o território. A Amazônia possui três quartos de toda diversidade de Annonaceae com 27 gêneros e cerca de 280 espécies, a Mata Atlântica abriga 15 gêneros e 91 espécies das quais dois gêneros e 40 espécies são endêmicas, o Cerrado possui 10 gêneros e aproximadamente 47 espécies de Annonaceae em que nenhum é endêmico do bioma (LOPES e MELLO-SILVA, 2014).

Esta é constituída por árvores e arbustos que se caracterizam por apresentarem flores vistosas, odor forte e característico exalado do tronco ou dos ramos, fibras longas e resistentes na casca, além de folhas alternadas ou dísticas (PONTES et al., 2004; SILVA e SILVA, 2006). Muitas anonáceas são frutíferas, com sabor característico e bastante apreciado tendo importância econômica em várias regiões, como a pinha (*Annona squamosa*), graviola (*Annona muricata*), cherimóia (*Annona cherimola*), biriba (*Rollina deliciosa*) e anona lisa (*Annona reticulata*) (SOBRINHO, 2010).

Muitas anonáceas são utilizadas na medicina popular por várias comunidades por causa de suas diferentes propriedades biológicas, atribuídas aos alcaloides, acetogeninas e flavonoides, principais componentes bioativos encontrados em gêneros específicos de anonáceas (FORMAGIO et al., 2010). O fruto da *Annona spinescens* é utilizado para o tratamento de úlceras (FENNER et al., 2006), infusão de frutos e sementes de *Annona crassiflora* são usados como antidiarreico (VILA VERDE et al., 2003), folhas de *Annona squamosa* são utilizadas no tratamento de furúnculos e úlceras (FENNER et al., 2006), o extrato das folhas de *Duguetia lanceolata* é usado como anti-inflamatório (SOUSA et al., 2008) e *Annona glabra* tem sido usado como vermífugo e anti reumático (SIEBRA, 2007).

Diversas classes de compostos químicos são isolados de espécies da família Annonaceae como substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, catequinas, proantocianidinas, alcaloides, acetogeninas, óleos essenciais, dentre muitos outros (FORMAGIO et al., 2010), entretanto os estudos sobre a composição química de espécies desta família só foram intensificados a partir da década de 1990, na grande maioria pela busca de acetogeninas e alcaloides, compostos com um amplo espectro de ações biológicas (MATSUMOTO et al., 2010). Trabalhos recentes evidenciam que plantas desta família apresentam ampla atividade biológica, COSTA et al. (2013) relatam a mortalidade de 100% de larvas de *Aedes aegypti* em extrato bruto metanólico de *Anona coriácea* e *Anona mucosa*, PONTES et al. (2007) demonstraram a atividade acaricida do óleo essencial extraído de folhas e frutos de *Xylopiya sericea* sobre o ácaro rajado, uma praga agrícola que afeta várias culturas em todo o mundo, em um trabalho de revisão KRINSK et al (2014) relataram o potencial inseticida de várias espécies de anonáceas como *Anona cherimólia*, *Anona cornifolia*, *Anona dioica*, *Anona montana* e *Anona atemoya* contra lepdópteros que atacam várias culturas.

Dentre a biodiversidade de anonáceas no estado de Goiás várias espécies se destacam, seja pela importância econômica que desempenham ou pela ampla ocorrência, como é o caso da *Annona crassiflora*, popularmente chamada de araticum, bastante apreciada pelos frutos (TELLES et al., 2003), *Annona squamosa*, conhecida como fruteira do conde e cultivada em alguns pomares (JUNQUEIRA et al., 2001), *Annona muricata*, graviola, apreciada pelo sabor característico do fruto e usado como planta medicinal (SILVA et al., 2010) e a *Cardiopetalum calophyllum*, chamada de imbirinha, bastante comum nas áreas de transição entre Cerrado e Cerradão, seus frutos são utilizados por alguns animais silvestres como fonte de alimento (ELIAS, 2010).

1.2 *Cardiopetalum calophyllum*

A *C. calophyllum* (Figura 1A) é uma espécie semidecídua, que floresce entre os meses de setembro e outubro (Figura 1B) e frutifica de fevereiro a abril (Figura 1C e Figura 1D). Possui ampla distribuição no Brasil central, Triângulo Mineiro, Goiás e Mato Grosso, seus frutos servem como alimentos para animais silvestres, que atuam como dispersores de sementes, as flores exalam um odor característico que atraem insetos polinizadores da família Nitidulidae (LOPES e MELLO-SILVA, 2014; ELIAS, 2010; SILVA et al., 2009).



Figura 1: Indivíduo de *Cardiopetalum calophyllum* (A). Ramo de *Cardiopetalum calophyllum* com flores (B). Ramo de *Cardiopetalum calophyllum* com frutos (C). Frutos de *Cardiopetalum calophyllum* (D). Fonte: (A) Elias (2010). (B, C, e D) própria.

Algumas comunidades utilizam a *C. calophyllum* como planta medicinal. Na cidade de Ouro Verde de Goiás o xarope e a decocção das sementes do fruto são usados

no tratamento de bronquite, sinusite, dismenorreia e como carminativo (SILVA, 2007). COELHO et al. (2009a) relatam o uso da *C. calophyllum* no tratamento de febres por comunidades da região Centro-Oeste.

Os princípios ativos responsáveis pela atividade biológica podem derivar de toda a planta ou de partes dela. SÉGUINEAU et al. (1991) identificaram uma série de alcaloides isoquinolínicos da casca do caule da *C. calophyllum*, em que o mais abundante foi a liriodenina, que possui relatos na literatura de alta atividade citotóxica, antiagregante plaquetária, antibacteriana e antifúngica (SILVA et al., 2007). Com exceção do trabalho de SÉGUINEAU et al. (1991) a literatura não apresenta dados sobre a química da *C. calophyllum*, havendo porém o relato de atividade do extrato sobre larvas de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2013; COELHO et al., 2009b), atividade leishmanicida para *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania amazonensis* (FOURNET et al., 1994), atividade ovicida e ninficida para *Rhodnius neglectus*, vetor da doença de Chagas (COSSOLIN e WALTER, 2010).

1.3 Metabolismo especial e óleos essenciais

O metabolismo especial em plantas é responsável pelas suas relações com o ambiente em que se encontra, não sendo apenas limitado para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas é primordial para a sua sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema. A partir desse metabolismo várias substâncias são formadas, sendo em sua grande maioria compostos biologicamente ativos (DINIZ et al., 2007; VIEGAS JR et al., 2006).

Entre as substâncias sintetizadas pelas plantas como metabólitos especiais, encontram-se os constituintes dos óleos essenciais, que são sintetizados em todos os órgãos da planta como flores, folhas, cascas, rizomas e frutos. São caracterizados por ser uma mistura complexa desses metabólitos, apresentam alta volatilidade, odor forte, são lípidos, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, geralmente com densidade mais baixa que a água. Segundo a International Standard Organization (ISO) os óleos essenciais são definidos como os produtos obtidos de diferentes partes de plantas através de destilação por arraste a vapor d'água, ou como produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (BIZZO et al., 2009; ANDRADE, 2013; SANTANA, 2013).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos, que são sintetizados na rota do ácido mevalônico (Figura 2), são formados por uma mistura complexa de cerca de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações (MAIA et al., 2015; BAKKALI et al, 2008). Os terpenos são formados por unidades básicas de isopreno, compostas de 5 carbonos, e são classificados de acordo com número de unidades isoprênicas em monoterpenos com 10 carbonos, sesquiterpenos com 15 carbonos e diterpenos com 20 carbonos (SANTANA, 2013; PERES, 2004).

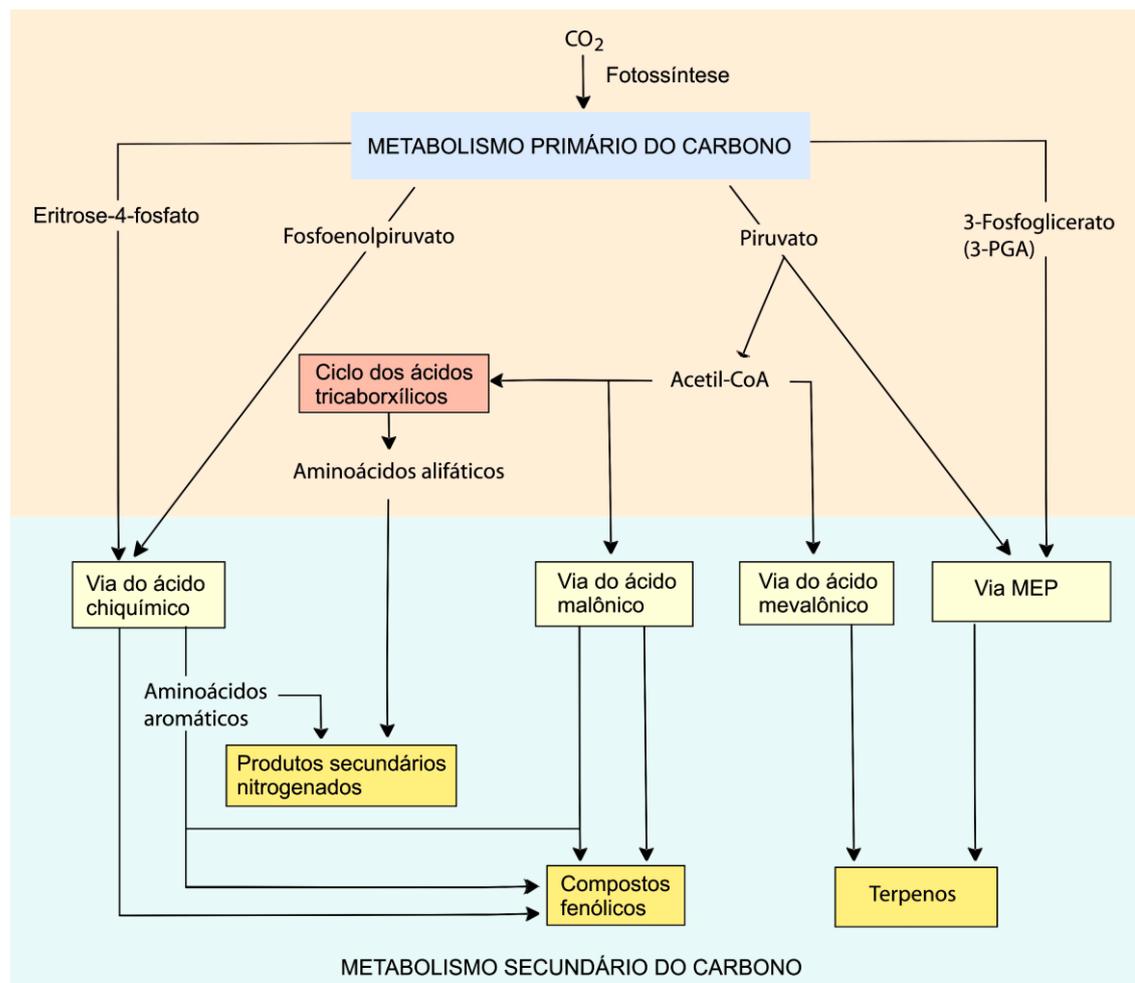


Figura 2: Biossíntese simplificada de terpenos, via mevalonato. Fonte: ZEIGER (2006).

Os metabólitos especiais sofrem a influência de diversos fatores como genéticos, climáticos e edáficos. A interação das condições do ambiente e a planta pode redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre essas interações pode-se ressaltar as interações da planta produtora de óleo com outras plantas, através da alelopatia, interação com insetos e microrganismos por meio de indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, idade da planta, estágio de desenvolvimento, luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de

coleta, técnicas de colheita e pós colheita e poluição atmosférica (SANTANA, 2013; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; MORAIS, 2009).

Vários trabalhos relacionam o teor e a composição química do óleo essencial produzido por plantas com a sazonalidade. BOTREL et al. (2010) obtiveram maior teor de óleo essencial de *Hyptis marruboides* no verão e na primavera quando comparados com o teor obtido no inverno. PAULUS et al. (2013) verificaram que para o óleo essencial de cidrô (*Aloysia triphylla*) o horário de colheita influencia a composição química e o rendimento. Identificaram também que o horário de colheita deve ser determinado em função da sazonalidade, no mês de fevereiro foi encontrado o maior rendimento na colheita realizada entre as 16 e 18 horas, com predominância do geranial, neral, nerolidol e limoneno. Segundo CUNHA (2011) o óleo essencial de *Aniba duckei* possui maior teor nos meses secos do que nos períodos chuvosos. SANTOS e MARTINS (2007) verificaram diferenças no teor relativo de citral e geraniol no óleo essencial do *Cymbopogon citratus* em função do horário e do local de coleta.

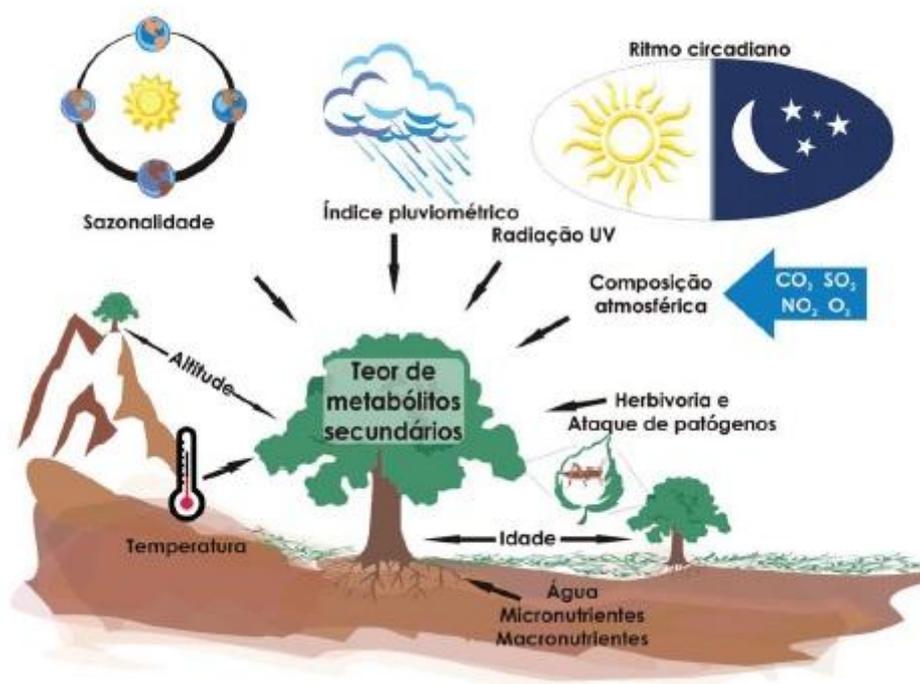


Figura 3: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos especiais em plantas. Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007).

1.4 Aplicações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são amplamente utilizados na indústria de cosméticos, perfumaria, alimentos, farmacêutica, dentre outras. São empregados, principalmente como aromas, fragrâncias, composições farmacêuticas, além de serem comercializados na forma bruta ou beneficiada (BIZZO et al., 2009).

De acordo BAKKALI et al. (2008) a composição química do óleo essencial determina suas aplicações e também suas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antioxidante e outras. ANDRADE (2013) salienta que essas atividades, atribuídas aos constituintes dos óleos essenciais, representam uma extensão do papel ecológico que eles exercem nas plantas, defendendo-as de fitopatógenos. A aplicação comercial do óleo essencial é determinada pela estrutura, grupo funcional e composição, essas características são responsáveis pela sua atividade biológica e propriedades físico-químicas.

A literatura descreve várias atividades atribuídas aos óleos essenciais. SANTOS et al. (2014) descreve o potencial antibacteriano do óleo essencial de *Lippia gracilis* na inibição do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris*, bactéria fitopatogênica causadora do cancro bacteriano em videiras. FONSECA et al. (2015) avaliaram o potencial antifúngico do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*, obtendo inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina*. MOARAI et al. (2006) descreveram ação antioxidante para o óleo essencial extraído de *Croton zenhtneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophylloides*. BORGES et al. (2012) analisaram a atividade tripanocida de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro, obtendo melhores resultados para *Chenopodium ambrosioides*, *Lippia origanoides* e *Lippia sidoides* ($IC_{50} = 21,3; 26,2$ e $28,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente).

1.5 *Trypanosoma cruzi* e atividade tripanocida

Muitos óleos essenciais têm apresentado atividade antiparasitária *in vitro* e vêm se destacando como potenciais substâncias para o desenvolvimento de novos medicamentos antiparasitários que possuam ao mesmo tempo menor citotoxicidade e maior eficácia para a quimioprofilaxia e quimioterapia, em especial das doenças negligenciadas (BORGES et al, 2012; ANDRADE, 2013; CLEMENTE et al, 2007). O

Ministério da Saúde (2010) define doenças negligenciadas como sendo aquelas que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam fator de entrave ao desenvolvimento de países. Como exemplo de doença negligenciada pode-se citar a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*.

O *T. cruzi* (Figura 4) é um parasita heteroxeno, parasitando hospedeiros intermediários na forma epimastigota e hospedeiros definitivos na forma tripomastigota. O homem funciona como hospedeiro definitivo do *T. cruzi*, que pode parasitar qualquer tipo celular, tendo preferência por células do tecido muscular cardíaco e liso. Na fase aguda a doença pode passar despercebida, geralmente é assintomática, as manifestações mais graves são apresentadas na fase crônica da doença, quando o músculo cardíaco já está seriamente comprometido, e envolvem falta de ar, taquicardia, braquicardia e inchaço nos membros inferiores (ARGOLO et al, 2008; NEVES et al, 2004).



Figura 4: Forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Fonte: ALBUQUERQUE et al. (2015).

De acordo SILVEIRA et al. (2000) a quimioterapia para doença de Chagas é um grande desafio, apenas duas drogas são usadas, o nifurtimox e o benzonidazol, no Brasil, apenas essa última é utilizada. PONTES et al. (2010) e COURA et al. (1997) salientam que o benzonidazol não confere eficácia plena no tratamento além de causar várias reações adversas nos pacientes.

Frente a esse panorama, os metabólitos especiais de plantas têm sido utilizados em diversos estudos *in vitro*, sobre o *T. cruzi*. SANTORO et al. (2007a) avaliaram a atividade tripanocida dos óleos essenciais de *Achillea millefolium*, *Syzygium aromaticum* e *Ocimum basilicum* sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas. Os

autores relatam a inibição do crescimento do parasita com todos os óleos testados, porém o que apresentou o menor valor de IC_{50} (concentração que inibe o crescimento do parasita em 50%) foi o óleo do *Syzygium aromaticum* ($99,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para epimastigotas e $57,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tripomastigotas).

Em outro estudo SANTORO et al. (2007b) avaliaram a atividade tripanocida do óleo essencial de *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*. O óleo essencial de *Origanum vulgare* possui atividade nas diferentes formas morfológicas de *T. cruzi*, na forma epimastigotas o óleo essencial inibiu o crescimento ($IC_{50} = 175 \mu\text{g mL}^{-1}$) e em tripomastigotas induziu a lise celular ($IC_{50} = 115 \mu\text{g mL}^{-1}$). O óleo essencial de *Thymus vulgaris* apresentou menores valores de IC_{50} , 77 e $38 \mu\text{g mL}^{-1}$, para epimastigotas e tripomastigotas respectivamente.

BORGES et al. (2012) estudaram a atividade de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro, *Lippia sidoides*, *Lippia origanoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia peitorais* e *Vitex agnus-castus*, e observaram que todos eles promoviam a inibição no crescimento e na sobrevivência do parasita. Os óleos de *L. sidoides* e *L. origanoides* foram os que apresentaram melhores resultados contra as formas amastigotas e tripomastigotas, respectivamente. Essa atividade, segundo os autores, foi atribuída aos componentes majoritários do óleo essencial timol e carvacrol (Figura 5).

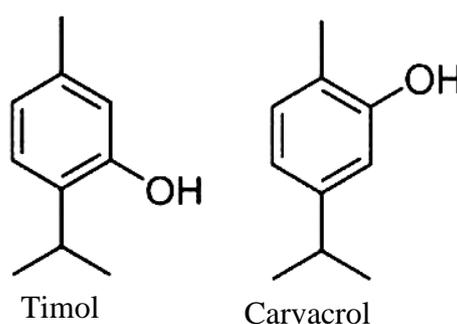


Figura 5: Estrutura química do Timol e Carvacrol, terpenos com atividade tripanocida.

Estes resultados indicam o potencial biológico dos óleos essenciais contra o *T. cruzi*, abrindo novas perspectivas para produção de drogas menos tóxicas e mais eficazes no tratamento da doença de Chagas e outras doenças parasitárias.

1.6 Citotoxicidade dos óleos essenciais

Várias pesquisas atribuem aos óleos essenciais atividades biológicas contra diversos parasitas, inclusive de interesse humano e veterinário. Com isso são necessários estudos que avaliem o potencial citotóxico desses compostos, uma vez que existe grande carência dessas informações. Segundo LIMA et al. (2006) a utilização de plantas medicinais é uma prática corriqueira e antiga da população, porém em grande parte dos casos não existem dados científicos que comprovem sua eficácia e espectro toxicológico. Existem vários relatos de compostos tóxicos presentes em plantas, CARNEIRO et al. (2015) relatam a toxicidade do geraniol e do citronelal sobre fibroblastos com percentuais de 84,7% e 41,5%, respectivamente, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. LIMA et al. (2012) analisaram a citotoxicidade do citronelol, um monoterpeno com atividade inseticida e aromático, descrevendo que na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ inviabiliza 84,07% de fibroblastos de mamíferos. ZAPATA et al. (2010) analisaram o efeito citotóxico de diversas espécies da família Asteraceae, reportando efeitos tóxicos em células VERO para o óleo essencial da *Ambrosia arborescens* ($\text{CC}_{50} = 15,7 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Segundo ANDRADE (2013) os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa dos compostos. De acordo ROGERO et al. (2003) a International Standard Organization (ISO 10993), preconiza o ensaio de citotoxicidade como primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer composto para seu uso, após comprovada a não toxicidade, é que o estudo de biocompatibilidade pode ter continuidade, realizando-se os ensaios em animais de laboratório.

Os testes de citotoxicidade é uma ferramenta para a avaliação de substâncias com potenciais aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e outros produtos, se são seguros para o consumo humano (ANDRADE, 2013). Segundo MALMONGE et al (1999) para um composto ser considerado seguro ele não deve causar a lise celular e nem afetar negativamente as funções celulares.

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, S; et al. Atlas acadêmico de parasitologia humana – principais parasitas humanos em ocorrência no Brasil. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: < <http://bit.ly/1HS56nC>>. Acesso em 26 jul. 2015.

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico.** 2013. 227p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Curso de Pós Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras.

ARGOLO, A. M.; et al. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, **Imperial Novo Milênio**, 2008.

BAKKALI, F.; et al. Biological effect of essential oils – A review. **Science Direct**, Atlanta, v. 46, p. 446-475, 2008. Disponível em: < <http://bit.ly/1CEmPu7>>. Acesso em 29 jun 2015. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

BIZZO, H. R.; et al. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009. Disponível em: < <http://bit.ly/1LViUym>>. Acesso em 29 nov. 2014. doi.: 10.1590/S0100-40422009000300005.

BORGES, A. R.; et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 123-128, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1Km0Q2Y>>. Acesso em 13 jun. 2015.

BOTREL, P. P.; et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1CevFid>>. Acesso em: 13 mai. 2015. doi: 10.4025/actasciagron.v32i3.3415.

CARNEIRO, J. N. P.; et al. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 2, p. 29-36, 2015. Disponível em: < <http://bit.ly/1Nxxht7>>. Acesso em 27 jun. 2015.

CLEMENTE, M. A.; et al. Avaliação do potencial de plantas medicinais no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, sup. 2, p. 516-518, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1JxB6kg>>. Acesso em: 27 jun. 2015.

COELHO, A. A. M.; et al. Efeitos de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster máxima* (Uhler) (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 444-451, 2009a. Disponível em: <<http://bit.ly/1AR7YME>>. Acesso em: 25 nov. 2014. doi: 10.1590/S0085-56262009000300020.

COELHO, A. A. M.; et al. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae), em condições de laboratório. **BioAssay**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2009b. Disponível em: <<http://bit.ly/1GNRpIT>>. Acesso em: 13 dez. 2014.

COSSOLIM, J. F. S.; WALTER, R. Efeito biocida do extrato metanólico de *Cardiopetalum calophyllum* (SCHLETDL.) (ANNONACEAE) sobre ovos e ninfas de *Rhodnius neglectus* (LENT, 1954) (HEMIPTERA-REDUVIIDAE). In Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Mato Grosso, 9., 2010, Cáceres, MT. **Anais do Congresso de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Mato Grosso- UNEMAT: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação**, 2010. V. 6. 487p. p. 230-235.

COSTA, M. S.; et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 184-190, 2013. Disponível em: < <http://bit.ly/1GN8WdU>>. Acesso em 19 dez. 2014.

COURA, J. R.; et al. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. avaliação preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 2, p. 139-144, 1997. Disponível em: < <http://bit.ly/1RHKQaN>>. Acesso em: 22 mai. 2015. doi: 10.1590/S0037-8682199700020009.

CUNHA, L. N. Influência sazonal no teor de linalol do óleo essencial da *Aniba duckei* Kostermans cultivada em ambiente natural na reserva florestal Ducke. **Ciência e Natura**, v. 33, n. 1, p. 7-15, 2011. Disponível em: < <http://bit.ly/1gbNc64>>. Acesso em 20 jun. 2015.

DINIZ, A. C. B.; et al. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 443-450, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1HvnGmy>>. Acesso em 28 jan. 2015. doi.: 10.1590/S0102-33062007000200017.

ELIAS, M. A. D. S. **Ecologia reprodutiva de *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae) em fragmentos de Cerrado do Brasil Central**. 2010. 48p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução). Programa de Pós Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Goiás.

FENNER, R.; et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006. Disponível em:< <http://bit.ly/1INFNkk>>. Acesso em: 23 jan. 2015. doi.: 10.1590/S1516-93322006000300007.

FONSECA, M. C. M.; et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2015. Disponível em: < <http://bit.ly/1ItE73r>>. Acesso em 30 jun. 2015.

FORMAGIO, A. S. N.; et al. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010. Disponível em:< <http://bit.ly/1NwRPCh>>. Acesso em 10 dez. 2014.

FOURNET, A.; et al. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Atlanta, v. 41, n. 1, p. 19-37, 1994. Disponível em: < <http://bit.ly/1STxtqr>>. Acesso em 27 jun. 2015.

JUNQUEIRA, N. T. V.; et al. **Principais doenças da fruteira do conde no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2001. 33p. (Circular Técnica, 16).

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1J53V7i>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

KRINSKI, D.; et al. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, Ed. esp., p. 225-242, 2014. Disponível em: < <http://bit.ly/1wWWojJ>>. Acesso em: 03 dez. 2014. doi: 10.1590/S0100-29452014000500027.

LIMA, A. P.; et al. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 10-12, 2006. Disponível em: < <http://bit.ly/1U9tuYo>>. Acesso em: 30 jun. 2015.

LIMA, J. P.; et al. Avaliação do potencial antiépimastigota e citotoxicidade do citronelol. **Caderno de Cultura e Ciência**, Crato, v. 11, n. 1, p. 38-41, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1BMy5cN>>. Acesso em 24 jun. 2015.

LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, Ed. esp., p. 125-131, 2014. Disponível em: < <http://bit.ly/1LH3y3v>>. Acesso em 03 dez. 2014. doi.: 10.1590/S0100-29452014000500015.

MAIA, T. F.; et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 1, p. 105-116, 2015. Disponível em: < <http://bit.ly/1FRW9Gk>>. Acesso em: 22 jun 2015.

MALMONGE, S. M.; et al. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo in vitro. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, n. 1, p. 49-54, 1999. Disponível em: < <http://bit.ly/1IOKx9j>>. Acesso em 30 jun. 2015.

MATSUMOTO, R. S.; et al. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010. Disponível em:<

<http://bit.ly/1GZsqiP>>. Acesso em 17 jan. 2015. doi.: 10.1590/S0102-33062010000300005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1TV0eCB>>. Acesso em 15 mai. 2015.

MORAIS, S. M.; et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006. Disponível em: < <http://bit.ly/1GO5b80>>. Acesso em 28 jun. 2015. doi.: 10.1590/S0100-40422006000500004.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, suplemento – CD Rom, 2009. Disponível em: < <http://bit.ly/1RaUF0w>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

NEVES, D. P.; et al. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In. Parasitologia Humana. São Paulo: **Atheneu**. 2004, p. 85-108.

PAULUS, D.; et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidrô em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013. Disponível em: <<http://bit.ly/1Bk8NCV>>. Acesso em: 12 mai. 2015. doi: 10.1590/S0102-05362013000200005.

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

PONTES, A. F.; et al. Flora paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004. Disponível em: < <http://bit.ly/1LTMG6L>>. Acesso em: 03 dez. 2014. doi. 10.1590/S0102-3306200400020008.

PONTES, W. J. T.; et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1coUwZJ>>. Acesso em 07 jan. 2015. doi.: 10.1590/S0100-40422007000400015.

PONTES, V. M. O.; et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182-187, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1U9nL4N>>. Acesso em 29 jun. 2015. doi.: 10.1590/S0037-86822010000200015.

ROGERO, S. O.; et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003. Disponível em: < <http://bit.ly/1HvHiXG>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

SANTANA, H. C. D. **Caracterização química do óleo essencial de Baccharis reticularia DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal**. 2013. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília.

SANTORO, G. F.; et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 283-290, 2007a. Disponível em: < <http://bit.ly/1eRbcei>>. Acesso em: 27 jun. 2015.

SANTORO, G. F.; et al. Effect of orégano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, p. 783-790, 2007b. Disponível em: < <http://bit.ly/1I0GbPm>>. Acesso em 30 jun. 2015. doi.: 10.1007/S00436-006-0326-5.

SANTOS, R. T.; MARTINS, R. C. C. Variação química da constituição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão). **Revista PIBIC**, v. 4, n. 1, p. 63-70, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1JwE2uz>>. Acesso em 19 jun. 2015.

SANTOS, M. M.; et al. Estudo dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. viticola in vitro. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 277-280, 2014. Disponível em: < <http://bit.ly/1CaC8Ab>>. Acesso em 17 jun. 2015. doi.: 10.1590/0100-5405/1958

SÉGUINEAU, C.; et al. Isoquinoline alkaloids from *Cardiopetalum calophyllum*. **Planta Médica**, v. 57, n. 1, p. 581, 1991. Disponível em: < <http://bit.ly/1TVACaH>>. Acesso em 12 dez. 2014.

SIEBRA, C. A. **Atividades biológicas de *Annona glabra* Linn., Annonaceae**. 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

SILVA, J. A. C.; SILVA, M. F. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas. Brasil – I. Famílias Annonaceae e Gnetaceae. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 1, p. 53-58, 2006. Disponível em: < <http://bit.ly/1LBVeBg>>. Acesso em: 03 dez. 2014. doi.: 10.1590/S0044-59672006000100007.

SILVA, D. B.; et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1IOjhI2>>. Acesso em: 13 dez. 2014. doi.: 10.1590/S0100-40422007000800004.

SILVA, C. S. P. **As plantas medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil: uma abordagem etnobotânica**. 2007.175p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Programa de Pós Graduação em Botânica, Universidade de Brasília.

SILVA, J. S.; et al. Importância do uso de plantas medicinais em comunidades rurais no Sudoeste de Goiás. **Cadernos de Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1R5607K>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

SILVA, C. A.; et al. Floração e sistema reprodutivo de *Cardiopetalum calophyllum* SCHLETDL (Annonaceae), em fragmento florestal de área de Cerrado no município de Tangará da Serra – MT. In: I BIOTA – Ciclo de Estudos de Biologia de Tangará da

Serra, I., 2009, Tangará da Serra, MT. **Anais do I BIOTA da Universidade do Estado do Mato Grosso**: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2009.

SILVEIRA, C. A. N.; et al. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 1, p. 191-196, 2000. Disponível em: < <http://bit.ly/1JqL4Up>>. Acesso em: 18 mai. 2015.

SOBRINHO, R. B. Potencial de exploração de anonáceas no Nordeste do Brasil. In: Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria, 17., 2010, Fortaleza, Brasil. Online. Disponível em: < <http://bit.ly/1NwRkbh>>. Acesso em 12 dez. 2014.

SOUSA, O. V.; et al. Efeitos atinociceptivo e antiinflamatório do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 398-402, 2008. Disponível em: < <http://bit.ly/1NwUuM3>>. Acesso em: 13 jan. 2015.

TELLES, M. P. C.; et al. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003. Disponível em: < <http://bit.ly/1C9B2Vs>>. Acesso em 13 jan. 2015. doi.: 10.1590/S0100-84042003000100013.

VIEGAS JR, C.; et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006. Disponível em: < <http://bit.ly/1FRTtsj>>. Acesso em 3 mar. 2015. doi.: 10.1590/S0100-40422006000200025.

VILA VERDE, G. M.; et al. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do Cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, Sup., p. 64-66, 2003. Disponível em:< <http://bit.ly/1KsLA4B>>. Acesso em: 13 jan. 2015. doi.: 10.1590/S0102-695X2003000300024.

ZAPATA, B.; et al. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de La familia Asteraceae. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 101-103, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1JqMBtD>>. Acesso em 28 jun. 2015.

ZEIGER, E; et al. Secondary metabolites and Plant defense. In: Plant Physiology. 4^o Ed., **Sinauer Associates**, 2006. cap 13.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação sazonal qualitativa da composição química do óleo essencial de *C. calophyllum* e a atividade biológica sobre cepas Y de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os constituintes do óleo essencial extraído das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* procedentes de área de Cerrado da cidade de Rio Verde;
- Comparar o teor e a composição do óleo essencial extraído das folhas de *C. calophyllum* em diferentes épocas do ano em Rio Verde;
- Avaliar a atividade tripanocida e citotóxica *in vitro* do óleo essencial extraído de folhas, flores e frutos de *C. calophyllum* sobre *Trypanosoma cruzi*.

CAPÍTULO I: Composição química do óleo volátil de *Cardiopetalum calophyllum* coletada em área de Cerrado.

(Normas de acordo com a revista Ciência Rural)

RESUMO

A família Annonaceae é constituída por cerca de 135 gêneros, com diversidade extensa de espécies grande quantidade de compostos químicos diversificados, advindos do metabolismo secundário. Entretanto as informações sobre a composição química de óleo essencial de várias espécies da família ainda são incipientes, como é o caso da *Cardiopetalum calophyllum*. O trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente o óleo essencial extraído das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum*, coletadas em áreas típicas do Cerrado goiano. A extração do óleo essencial foi feita através de hidrodestilação em aparelho de clewenger pelo período de 4 horas. A análise química do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a identificação dos constituintes pela comparação dos espectros obtidos com os espectros disponíveis na literatura e pelo cálculo do índice de retenção (IR). Foram identificados 23 compostos no óleo essencial de folhas em que o composto majoritário foi o sesquiterpeno oxigenado espatulenol (28,78%); no óleo de flores foram identificados 31 compostos com predominância dos sesquiterpenos hidrocarbonados germacreno-D (37,03%) e germacreno-B (13,72%); e no óleo de frutos 17 compostos com predominância dos sesquiterpenos hidrocarbonados germareno-D (28,19%) e

germacreno-B (20,90%) e do sesquiterpeno oxigenado espatulenol (11,53%). Este trabalho descreve pela primeira vez a composição química do óleo essencial das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum*, contribuindo significativamente para o conhecimento químico da espécie.

Palavras-chave: Óleo essencial, Annonaceae, composição química, imbirinha, espatulenol, germacreno-D.

**CHAPTER I: Chemical composition of the volatile oil of
Cardiopetalum calophyllum collected in Cerrado environment.**

(Standards in accordance with the Rural Science magazine)

ABSTRACT

The Annonaceae family consists of about 135 genera, with a wide diversity of species and large amount of diverse chemical compounds, arising from the secondary metabolism. However the information about chemical composition of the essential oil of various species of the family are still incomplete, as is the case of *Cardiopetalum calophyllum*. The study aimed to chemically characterize the essential oil extracted from the leaves, flowers and fruits of *C. calophyllum*, collected in typical areas of Goias Cerrado. The essential oil extraction was done by hydrodistillation in cleverger apparatus for a period of 4 hours. The essential oil chemical analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry and the identification of constituents by comparing the spectra obtained with the spectra from the literature and by calculating the retention index (RI). 23 compounds were identified in the essential oil of leaves where the major compound was the oxygenated sesquiterpene spathulenol (28.78%); in the flowers oil were identified 31 compounds with a predominance of hydrocarbon germacrene-D sesquiterpenes (37.03%) and germacrene-B (13.72%); in the fruit oil it was found 17 predominantly composed of sesquiterpene hydrocarbon germacrene-D

(28.19%) and germacrene-B (20.90%) and oxygenated sesquiterpene spathulenol (11.53%). This paper describes for the first time the chemical composition of essential oil from leaves, flowers and fruits of *C. calophyllum*, contributing significantly to the chemical knowledge of the species.

Key words: Essential oils, Annonaceae, chemical composition, imbirinha, spathulenol, germacrene-D.

1.1. INTRODUÇÃO

A família Annonaceae possui cerca de 2500 espécies, agrupadas em aproximadamente 135 gêneros com distribuição pantropical. No Brasil ocorrem 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros. O Cerrado abriga 10 gêneros e 47 espécies, das quais nenhuma é endêmica do domínio, porém algumas são bastante comuns como, por exemplo, *Annona crassiflora*, *Duguetia furfuracea*, *Xylopia aromática* e *Cardiopetalum calophyllum* (LOPES & MELLO-SILVA, 2014). Segundo ISHARA & MAIMONI-RODELLA (2011) as anonáceas ocupam o décimo terceiro lugar em número de espécies por família no Cerrado. Essa família é caracterizada pela presença de terpenoides, alcaloides e óleos essenciais cuja composição química é predominante de monoterpenos e sesquiterpenos (COSTA et al., 2008).

A diversidade da flora da família Annonaceae apresenta grande potencial para a produção de metabólitos especiais com aplicações diversas. Alguns gêneros são quimicamente bem documentados, como *Xylopia*, no óleo essencial extraído das folhas e frutos é comum o relato da presença de óxido de cariofileno, α -pineno, α -terpineno, limoneno, espatulenol, germacreno-D, *trans*- β -guaïeno e β -cariofileno em concentrações consideráveis (SANTOS, et al. 2004; PONTES et al., 2007; VALTER et al., 2008). O gênero *Annona* também é bastante caracterizado, com a constante presença de cariofileno, canfeno, α -pineno e β -pineno no óleo essencial extraído das folhas (CAMPOS et al., 2014; BANDEIRA et al., 2011). Em *Duguetia* compostos como β -felandreno, biciclogermacreno, espatulenol, germaceno-D, *trans*-cariofileno, sabineno e terpinen-4-ol são relatados com frequência (VALTER et al., 2008).

Contudo, a pesquisa de substâncias ativas derivadas de plantas dessa família ainda é incipiente (NASCIMENTO et al., 2003; SILVA, 2007; NUNES et al., 2012;

ALMEIDA et al., 2014; KRINSKI et al., 2014). A *C. calophyllum* é uma espécie com ampla distribuição pelo domínio, entretanto após revisão de literatura não foram encontrados dados referentes à composição química e aplicação do seu óleo essencial, assim, objetivou-se nesse trabalho comparar a composição química do óleo essencial extraído das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* coletadas em áreas de Cerrado.

1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1. Material vegetal

As folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* foram coletadas nos meses de março, setembro e dezembro de 2014, respectivamente, na cidade de Rio Verde (GO) em área nativa de Cerrado da Universidade de Rio Verde - UniRV. A espécie foi identificada pelos biólogos Odirlei Simões e Marcelo Nogueira e a exsicata depositada no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, e se encontra depositada sob o registro 3815.

O material foi levado ao laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano, *campus* Rio Verde, passando por triagem, sendo descartado o material injuriado.

1.2.2. Obtenção do óleo volátil

O óleo foi obtido pelo processo de hidrodestilação, pelo período de 4 horas, segundo metodologia empregada por SIQUEIRA et al. (2011). O óleo essencial foi extraído da fase aquosa com diclorometano, filtrado com sulfato de sódio anidro, o solvente removido por evaporação a temperatura ambiente e o óleo armazenado a -4 °C até o momento da análise.

1.2.3. Identificação de metabólitos especiais

A análise química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM, Shimadzu, QP-5000). Uma coluna capilar DB – 5 (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm) foi utilizada com as seguintes características

operacionais: injetor a 220 °C , detector a 240 °C , injeção split (1/20), volume de injeção 1 µl de solução , rampa 60 °C em 300 °C , 3 °C / min.

As substâncias foram identificadas por comparação dos seus espectros de massa com banco de dados (11 lib. Nist) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com a literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C10-C29) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação dos metabólitos especiais identificados no óleo essencial extraído das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum*, suas quantidades relativas e o índice de retenção são apresentados na Tabela 1. Através dos dados do CG/EM (Apêndice B) foram identificados 23 compostos no óleo essencial de folhas, e o composto majoritário encontrado foi o espatulenol (28,78%) (Figura 1A), no óleo essencial de flores foram identificados 31 compostos, sendo o germacreno-D (37,03%) (Figura 1B) e o germacreno-B (13,72%) (Figura 1C) os majoritários, para os frutos foram identificados 17 compostos com predominância do germacreno-D (28,19%), germacreno-B (20,90%) e espatulenol (11,53%).

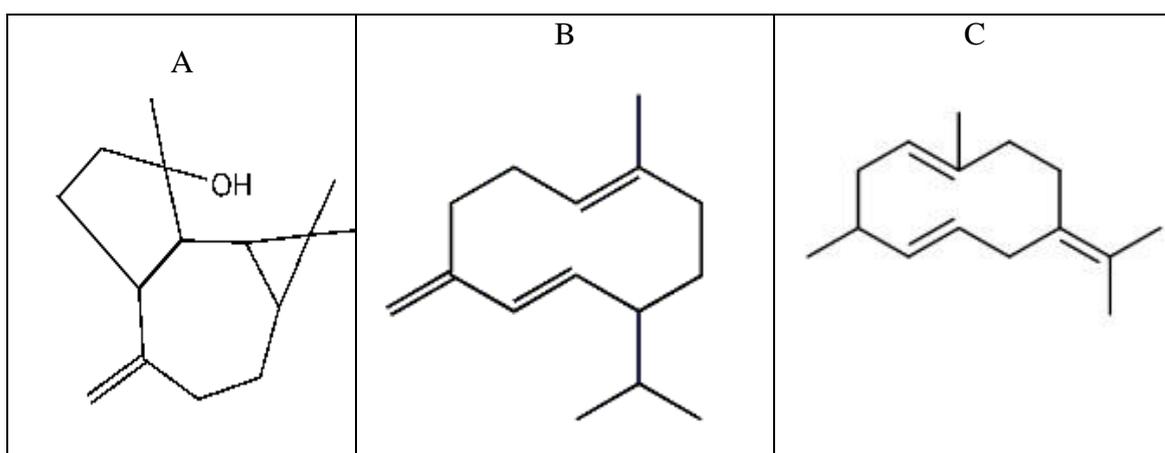


Figura 1: Estrutura química dos constituintes majoritários do óleo essencial de folhas, flores e frutos de *C. calophyllum*. A: espatulenol. B: germacreno-D. C: germacreno-B. Fonte: PHEROBASE (2015).

A partir da Tabela 1 é possível verificar que os sesquiterpenos representam a maior porcentagem dos compostos identificados. Nos estudos de outras espécies da

família Annonaceae resultados semelhantes foram encontrados. FEITOSA et al. (2009) caracterizaram o óleo essencial de galhos da *Rollinia leptopetala* como sendo desprovidos de monoterpenos, enquanto os sesquiterpenos, principalmente os oxigenados, eram abundantes. Avaliando a atividade acaricida do óleo essencial de folhas da *Xylopia sericea*, PONTES et al. (2007) relataram que aproximadamente 95% do óleo era formado pela mistura complexa de sesquiterpenos. CAMPOS et al. (2014) também descreveram predominância de sesquiterpenos nos óleos essenciais de *Annona emarginata* e *Annona squamosa*.

Tabela 1: Compostos presentes no óleo essencial das folhas, flores e frutos de *C. calophyllum*, coletados em área típica de Cerrado, na cidade de Rio Verde-GO no ano de 2014.

Composto	IR*	Área (%)		
		Folhas	Flores	Frutos
Monoterpenos hidrocarbonados				
cis- β -ocimeno	1007	-	0,06	0,10
γ -terpineno	1016	-	0,11	-
α -terpinoleno	1043	-	0,05	-
Monoterpenos oxigenados				
β -linalol	1052	-	0,13	-
4-terpineol	1130	-	0,15	-
p-Cimen-8-ol	1138	-	0,17	-
Criptona	1140	0,43	-	0,45
Sesquiterpenos hidrocarbonados				
δ -elemeno	1298	-	1,18	1,16
α -cubebeno	1311	-	0,12	-
Eugenol	1320	-	2,40	-
α -ilangeno	1334	-	0,14	-
Copaeno	1339	0,17	0,57	0,37
β -copaeno	1354	-	0,18	-
β -elemeno	1356	0,22	0,25	0,47
α -gurjuneno	1363	-	0,13	-
Cariofileno	1384	1,03	5,58	2,40
β -gurjuneno	1397	-	0,18	-
Aloaromadendreno	1404	0,84	0,90	0,66
α -guaieno	1409	-	0,16	-
Humuleno	1419	0,44	0,98	0,40
β -copaeno	1443	0,76	-	-
Germacreno-D	1448	0,43	37,03	28,19
β -selineno	1453	0,38	-	-
Isoledeno	1458	-	0,27	-
Viridifloreno	1462	1,08	-	-
Germacreno-B	1464	-	13,72	20,90
α -muroleno	1468	0,21	0,51	-
α -bulneseno	1472	-	-	0,72

γ -muroleno	1481	0,74	0,18	-
δ -cadineno	1491	0,62	-	0,71
(-) Aristoleno	1504	-	0,17	-
γ -gurjuneno	1523	-	3,41	-
Sesquiterpenos oxigenados				
Espatuleno	1544	28,78	0,57	11,53
Viridiflorol	1550	9,99	0,77	2,02
Elemol	1560	0,76	-	-
Óxido de cariofileno	1575	1,99	-	0,81
Cubenol	1583	0,67	-	-
Ent-espatulenol	1593	2,10	-	1,94
τ -cadinol	1605	1,58	0,43	-
(-) δ -Cadinol	1609	-	0,20	-
Acetato de (-) isolongifolol	1617	5,06	0,71	1,01
(Z,E) farnesol	1634	6,51	-	-
Óxido 2 de aromandendreno	1692	1,68	-	-
Monoterpenos		0,43	0,67	0,55
Sesquiterpenos		66,04	70,74	73,29

*IR: Índice de retenção

PEREIRA e TEIXEIRA (1999) justificam a presença de sesquiterpenos como um processo de adaptação da espécie vegetal ao ambiente frente a herbívoros, agentes patogênicos e organismos incrustantes. Em estudo analisando o óleo essencial de *Duguetia furfuracea*, VALTER et al. (2008) salienta que a presença de sesquiterpenos oxigenados não é comum em espécies do Cerrado, em decorrência das condições próprias do bioma, entretanto esse aspecto não foi observado no óleo essencial da *C. calophyllum*, e o espatulenol foi encontrado em altas concentrações em mais de um órgão. Este sesquiterpeno tem sido relatado como composto majoritário no óleo essencial extraído de folhas de outras espécies da família Annonaceae, como em *Guatteria schomburgkiana* (TRIGO et al., 2007), *Annona vepretorum* (COSTA et al., 2012), *Rollinia leptopetala* (COSTA et al., 2008) e *Duguetia furfuracea* (VALTER et al., 2008) dentre outras. Há ainda o relato do espatulenol em altas concentrações no óleo essencial de espécies dos gêneros *Annona*, *Artabotrys*, *Cleistopholis*, *Goniothalamus*, *Piptostigma*, *Uvaria* e *Xylopia* (TRIGO et al., 2007). No fruto da *C. calophyllum* o espatulenol também foi encontrado em altas concentrações (11,53%). Por essa predominância do espatulenol LIMA et al. (2004) e SIQUEIRA et al. (2011) recomendam a sua utilização como um marcador químico da família Annonaceae.

O germacreno-D também é comum em outras espécies da família Annonaceae, VALTER et al. (2008) relata a presença do germacreno-D em *Duguetia furfuracea* em concentrações consideráveis. CASTRO et al. (2006) e SOUZA et al. (2007) atribuem ao germacreno-D a atração de polinizadores, sua estrutura química imita feromônios sexuais de insetos, explicando a grande concentração do germacreno-D no óleo essencial de flores e frutos de *C. calophyllum*.

Alguns sesquiterpenos foram identificados no óleo essencial das três partes da *C. calophyllum* (folha, flor e fruto), diferindo na concentração. O copaeno apresenta atividade deterrente contra insetos e é de grande valor para a indústria por seu aroma característico (PEREIRA et al., 2008). O cariofileno apresenta várias atividades biológicas como espasmolítica, anestésica e anti-inflamatória (LIMBERGER et al., 2004). O humuleno é descrito pela literatura como sendo inseticida, antimicrobiano, antioxidante e anticancerígeno (ALMEIDA et al., 2011).

1.4. CONCLUSÃO

O óleo essencial de folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* são formados pela mistura complexa de mono e sesquiterpenos. Os constituintes majoritários foram o espatulenol (28,78%) no óleo essencial das folhas, o germacreno-D (37,03%) e germacreno-B (13,72%) nas flores e o germacreno-D (28,19%), germacreno-B (20,90%) e espatulenol (11,53%) no óleo essencial dos frutos. Este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum*, contribuindo significativamente para o conhecimento da espécie.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream: Illinois, 2007. 4v.

ALMEIDA, M. F. O.; et al. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1182-1187, 2011. Disponível em: <<http://bit.ly/1dCRy5j>>. Acesso em: 30 mai. 2015. doi: 10.1590/S0100-40422011000700015.

ALMEIDA, J. R. G. da S.; et al. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, Ed. especial, p. 258-264, 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/1x3PeZI>>. Acesso em: 30 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-29452014000500030.

BANDEIRA, J. M.; et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011. Disponível em: <<http://bit.ly/1FJGhZZ>>. Acesso em: 25 mai. 2015. doi: 10.1590/S1516-05722011000200006.

CAMPOS, F. G.; et al. Characterization of the chemical composition of the essential oils from *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ‘terra-fria’ and *Annona squamosa* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, Ed. especial, p. 202-208, 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/1wkiVso>>. Acesso em: 25 mai. 2015. doi: 10.1590/S0100-29452014000500024.

CASTRO, D. P.; et al. Não preferência de *Spodopptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006. Disponível em:<<http://bit.ly/1w3jtQb>>. Acesso em: 16 nov. 2014.

COSTA, E. V.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatterioopsis* species. **Phytochemistry**, Amsterdã, v. 69, n. 1, p. 1895-1899, 2008. Disponível em: <<http://bit.ly/1G5rqXx>>. Acesso em: 15 nov. 2014. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.005.

COSTA, E. V.; et al. Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. **Natural Product Commnications**, Ohio, v. 7, n. 2, p. 265-269, 2012. Disponível em: <<http://1.usa.gov/1InahyF>>. Acesso em: 25 mai. 2015.

FEITOSA, E. M. A.; et al. Chemical composition and larvival activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v.

20, n. 2, p. 375-378, 2009. Disponível em: <<http://bit.ly/1vu2nqT>>. Acesso em: 23 mai. 2015. doi: 10.1590/S0103-50532009000200024.

ISHARA, K. L. e MAIMONI-RODELLA, C. S. Pollination and dispersal systems in a Cerrado remnant (Brazilian Savanna) in southeastern Brazil. **Brazilian Archives Of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 629-642, 2011. Disponível em: <<http://bit.ly/18113KI>>. Acesso em: 30 nov. 2014.

KRINSKI, D.; et al. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, Ed. especial, p. 225-242, 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/1wWWojJ>>. Acesso em: 30 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-29452014000500027.

LIMA, M. A.; et al. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdã, v. 32, n. 3, p. 347-349, 2004. Disponível em: <<http://bit.ly/1BrpZVi>>. Acesso em: 15 nov. 2014. doi: 10.1016/j.bse.2003.08.006.

LIMBERGER, R. P.; et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004. Disponível em: <<http://bit.ly/1EGFSU7>>. Acesso em 29 mai. 2015. doi: 10.1590/S0100-40422004000600015.

LOPES, J. D. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, Ed. especial, p. 125-131, 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/1wpbbir>>. Acesso em: 11 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-29452014000500015.

NASCIMENTO, F. C. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003. Disponível em: <<http://bit.ly/1ys6D1d>>. Acesso em: 11 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-40422003000300006.

NUNES, C. dos R.; et al. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, Campos dos Goytacazes, v. 14, n. 1, p. 39-57, 2012. Disponível em: <<http://bit.ly/1ARp8d1>>. Acesso em: 30 nov. 2014.

PEREIRA, C. P.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (CERAMIALES, RODOPHYTA) 1. Significado ecológico. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 369-374, 1999. Disponível em: <<http://bit.ly/1PU3uk5>>. Acesso em 29 mai. 2015. doi: 10.1590/S0100-40421999000300015.

PEREIRA, F. J.; et al. Isolamento, composição química e atividade anti-inflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 3, p. 369-374, 2008. Disponível em: <<http://bit.ly/1HTYJm9>>. Acesso em: 29 mai. 2015. doi: 10915/7629.

PHEROBASE: Database of pheromones and semiochemicals [Internet], 2015. Disponível em <<http://bit.ly/1gCAT37>>. Acesso em 13 jun. 2015.

PONTES, W. J. T., et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p.838-841, 2007. Disponível em: <<http://bit.ly/1coUwZJ>>. Acesso em 27 mai. 2015. doi: 10.1590/S0100-40422007000400015.

SANTOS, B. R.; et al. Aspectos da anatomia e do óleo essencial em folhas de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 345-349, 2004. Disponível em: <<http://bit.ly/1G5JsLa>>. Acesso em 27 mai. 2015. doi:10.1590/S1413-70542004000200014.

SILVA, C. S. P. da. **As plantas medicinais no município de Ouro Verde de Goiás, GO, Brasil: uma abordagem etnobotânica**. 2007. 175p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Curso de Pós Graduação em Botânica, Universidade de Brasília.

SIQUEIRA, C. A. T.; et al. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriácea* and in vitro antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 33-40, 2011. Disponível em: <<http://bit.ly/1CWtwg7>>. Acesso em: 16 nov. 2014. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000004.

SOUZA, T. J. T.; et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007. Disponível em: <<http://bit.ly/1ADMVBU>>. Acesso em: 29 mai. 2015. doi: 10.1590/S0102-695X2007000300011.

TRIGO, J. R.; et al. Óleos essenciais de espécies de Annonaceae que ocorrem no Pará: *Guatteria schomburgkiana* Mart. e *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 113-116, 2007. Disponível em: <<http://bit.ly/1yF98vO>>. Acesso em 14 nov. 2014.

VALTER, J. L.; et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 373-378, 2008. Disponível em: <<http://bit.ly/1yF8Uov>>. Acesso em 16 nov. 2014. doi: 10.1590/S0102-695X2008000300011.

CAPÍTULO II: Teor e composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* em função da sazonalidade.

(Normas de acordo com a revista Ciência Rural)

RESUMO

Cardiopetalum calophyllum é uma espécie arbustiva, amplamente dispersa no Cerrado e na Amazônia. A composição química de óleos essenciais, assim como seu rendimento, depende, dentre outros aspectos da interação dos fatores abióticos e a espécie produtora. O objetivo do presente trabalho foi analisar a variação qualitativa dos metabólitos especiais e do teor do óleo essencial de folhas *C. calophyllum* coletadas entre março/14 a janeiro/15 na cidade de Rio Verde-GO. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho clewenger e analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os teores de óleo essencial apresentaram diferenças significativas entre as épocas, tendo maior produção no período de setembro/14 a janeiro/15. Os compostos majoritários presentes no óleo essencial foram o espatulenol, viridiflorol e germacreno-D, e apresentaram maiores teores relativos nos meses de março/14 (28,78%), junho/14 (10,93%) e outubro/14 (15,6%) respectivamente. As diferenças observadas ocorrem possivelmente em função da variação climática, precipitação e do estágio fenológico da *C. calophyllum*.

Palavras-chave: *Cardiopetalum calophyllum*, óleo essencial, sazonalidade, rendimento, composição química.

CHAPTER II: Content and Chemical composition of essential oil from *Cardiopetalum calophyllum* in seasonality of function.

(Standards in accordance with the Rural Science magazine)

ABSTRACT

Cardiopetalum calophyllum is a shrubby species, widely dispersed in the Cerrado and the Amazon. The chemical composition of essential oils, as well as their income depends, among other things of the interaction among abiotic factors and producing species. The objective of this study was to analyze the qualitative variation of special metabolites and essential oil content of *C. calophyllum* leaves collected between March/14 to January/15 in the city of Rio Verde. The essential oil was extracted by hydrodistillation in cleverger apparatus and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The essential oil content showed significant differences between the seasons, with higher production from September/14 to January/15. The major compounds present in the essential oil were spathulenol, viridiflorol and germacrene-D, with highest level for the months of March/14 (28.78%), June/14 (10.93%) and October/14 (15,6%) respectively. The differences possibly occur due to climate change, rainfall and phenological stage of *C. calophyllum*.

Key words: *Cardiopetalum calophyllum*, essential oil, seasonality, yield, chemical composition.

2.1. INTRODUÇÃO

A *Cardiopetalum calophyllum* é uma espécie com ampla distribuição no Cerrado brasileiro, fazendo parte da família Annonaceae, que é formada por cerca de 120 gêneros e aproximadamente 2300 espécies, possuindo grande diversidade no Brasil, sendo caracterizada pela presença de terpenoides, alcaloides e óleos essenciais (ELIAS et al., 2012). Algumas comunidades do estado de Goiás utilizam a *C. calophyllum* no tratamento de moléstias, como bronquites, sinusites, dismenorréias, febres e como carminativo, na forma de xarope e chás (COSTA et al., 2013; COSTA, 2011; NASCIMENTO et al., 2003).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis, formados pela mistura complexa de compostos orgânicos (ANDRADE et al., 2012), mistura essa determinada por fatores genéticos mas que sofrem grande influência de fatores abióticos. Esses estímulos do ambiente em que a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (MORAIS, 2009). GOBBO-NETO e LOPES (2007) listaram uma série de fatores abióticos que influenciam a composição química do óleo essencial como, temperatura, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, sazonalidade, poluição atmosférica e disponibilidade de água. Segundo PAULUS et al. (2013) a partir da determinação da melhor época de colheita é possível a obtenção de um maior rendimento de óleo essencial e do princípio ativo desejado, visto que a quantidade e a natureza dos constituintes não são constantes durante todo o ano.

Analisando a composição química da erva-cidreira (*Lippia alba*) em diferentes épocas, SILVA et al. (2006), encontraram o geranial como composto majoritário nas 4 estações do ano, porém o rendimento do óleo foi menor no inverno, os autores

atribuíram a alteração no rendimento do óleo por causa das menores temperaturas nessa época do ano. CERQUEIRA et al. (2009), encontraram variações na diversidade de compostos no óleo essencial de *Myrcia salzmannii*, onde no verão foram encontrados 15 compostos e no inverno apenas 9, ocorreu também decréscimo no percentual do composto majoritário, o β -cariofileno, que no verão estava presente na concentração de 41,5% e no inverno o percentual caiu para 24,1%. Na análise do óleo essencial de *Hyptis marrubioides*, BOTREL et al. (2010), obtiveram maior teor quando as plantas estavam em pleno florescimento, no inverno e outono houve decréscimo no rendimento. Foram observados também pelos autores, variação na concentração dos compostos majoritários, a α -tujona, com 26,7% no inverno e 11,1% na primavera.

Poucas são as informações sobre os metabólitos secundários da *C. calophyllum*, determinar a época de colheita em função da produção de princípios ativos é uma ferramenta para possíveis aplicações industriais, alimentícias, cosméticas, agrícolas, dentre tantas outras. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a variação no teor e na composição química do óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* de acordo com a sazonalidade.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local e condições climáticas do experimento

O município de Rio Verde se localiza na região sudoeste do estado de Goiás. Situa-se a 17°47'50'' de latitude Sul e 50°54'0'' de longitude oeste de Greenwich, com altitude de 739 m. Segundo a classificação de Koppen e Geiger, o clima se enquadra no tipo Aw, clima tropical com estação seca no inverno.

Tabela 2: Dados mensais de temperatura média, precipitação e umidade relativa do ar em Rio Verde, no período de março de 2014 a janeiro de 2015. Fonte: Inmet.

Meses	Temperatura média (°C)	Precipitação total (mm)	UR (%)
Março	25,5	350	80
Abril	25,0	120	80
Mai	23,0	0	71
Junho	S/L	25	76
Julho	21,0	50	60
Agosto	S/L	0	55
Setembro	23,0	50	50
Outubro	27,0	50	50

Novembro	20,0	380	85
Dezembro	19,5	350	88
Janeiro	20,0	125	80

S/L = SEM LEITURA

2.2.2 Coleta e preparo das amostras

As coletas das folhas foram realizadas entre março/2014 e janeiro/2015, na última semana de cada mês, entre as 05 e 08 horas. Foram coletadas cerca de 600 gramas de folhas de todas as partes das plantas, de ramos situados nas direções cardeais: N, S, L e O. Folhas injuriadas, amareladas, secas ou não desenvolvidas foram descartadas. As folhas foram homogeneizadas e para cada repetição, foram utilizadas 100 gramas de massa foliar *in natura* triturada.

2.2.3 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação em aparelho de clevenger, pelo período de quatro horas a partir da ebulição (SIQUEIRA et al., 2011). Para a purificação do óleo essencial, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, foram realizadas três lavagens do hidrolato com três porções de 10 mL de diclorometano por 15 minutos cada. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro, o sal foi removido por filtração simples e o solvente evaporado a temperatura ambiente por 24 horas.

2.2.4 Teor de óleo essencial

O rendimento do óleo essencial foi calculado relacionando a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal *in natura* utilizada na extração, através da fórmula $T\% = \text{Massa do óleo (g)} / 100 * 100$. A análise estatística dos dados foi realizada, utilizando o programa ASSISTAT 7.7. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de F e aplicado o teste de Scott-Knott.

2.2.5 Composição química do óleo essencial

A análise química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, Shimadzu, QP-5000). Uma coluna capilar DB – 5 (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm) foi utilizada com as seguintes características

operacionais: injetor a 220 °C , detector a 240 °C , injeção split (1/20), volume de injeção 1 µl de solução , rampa 60 °C em 300 °C , 3 °C / min.

As substâncias foram identificadas por comparação dos seus espectros de massas com banco de dados do *software* 11 lib. Nist do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção com a literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C10-C29) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

A composição química dos óleos essenciais não pôde ser comparada estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, pois foi analisada somente uma amostra composta, formada pelo agrupamento das repetições de cada tratamento.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos revelaram a ocorrência de variação sazonal significativa do teor de óleo essencial de *C. calophyllum* (Figura 1). Os maiores teores foram obtidos no período de setembro/2014 a janeiro/2015, esse período coincide com a época de floração e frutificação da *C. calophyllum*. NAGÃO et al. (2004) salientam que muitas espécies vegetais possuem produção maior de metabólitos especiais durante a floração e frutificação, emitindo substâncias aromáticas para atração de insetos, pássaros e mamíferos polinizadores.

O período com os menores teores de óleo essencial foi de março a agosto/2014, sendo que o mês de agosto apresentou o menor teor observado (0,049%), uma redução equivalente a 55% se comparado com o mês de outubro, em que foi obtido o maior teor (0,108%) de óleo essencial. Segundo FONSECA et al. (2007), no período em que a planta está emitindo novas folhas o teor de óleo essencial tende a ser menor, aumentando com o desenvolvimento do tecido foliar graças ao aumento de ductos foliares que armazenam óleos essenciais.

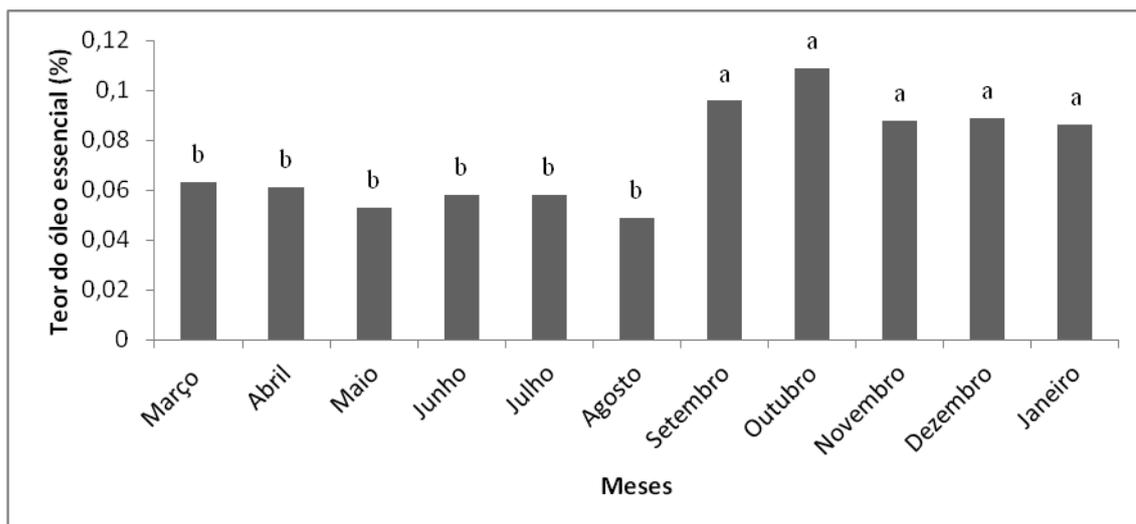


Figura 1: Teores médios de óleo essencial (%) na biomassa *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum*, em função da sazonalidade. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

VALTER et al. (2008) verificaram que folhas de *Duguetia furfuracea* coletadas no outono (período de estiagem) proporcionaram menores rendimentos de óleo essencial comparadas com as folhas coletadas no verão (período chuvoso). BOTREL et al. (2010), em estudo com a *Hyptis marrubioides*, observaram menor teor de óleo essencial no inverno, em que a espécie entrou em senescência (perda das folhas), durante a primavera a espécie iniciou a floração, tendo seu clímax no verão, nesse mesmo período o teor de óleo essencial também aumentou, passando de 0,27% para 0,42%. ANDRADE e GOMES (2000) e BARROS (2009) salientam que a temperatura pode beneficiar a síntese de determinados compostos nas plantas através do favorecimento enzimático, a temperatura do ambiente pode aumentar ou diminuir a atividade de enzimas utilizadas na reação. Esse fato poderia justificar o aumento do rendimento de óleo essencial, bem como da produção de certos constituintes. No entanto, para a *C. calophyllum*, o fator temperatura não parece estar influenciando de forma significativa a produção do óleo essencial, observa-se a temperatura média com pouca variação ao longo do período estudado.

Segundo LIMA et al. (2003), os terpenoides representam a maior classe de compostos presentes nos óleos essenciais, sendo voláteis e contribuindo significativamente para a fragrância das plantas que os produzem. O óleo essencial da *C. calophyllum* em todo o período analisado foi composto predominantemente pela mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos. Os sesquiterpenos hidrocarbonados tiveram variabilidade maior em relação aos sesquiterpenos oxigenados

e monoterpenos, essa última classe apresentou a menor variabilidade de compostos. Em outras espécies da família Annonaceae, os óleos essenciais também são formados pela mistura de terpenoides, entretanto com predominância dos monoterpenos. O óleo essencial extraído das folhas de *Rollinia leptopetala* é formado por 54,5% de monoterpenos e 45,5% de sesquiterpenos, de acordo COSTA et al. (2008a). No óleo essencial das folhas de *Duguetia furfuracea* os monoterpenos perfazem 68,6% (VALTER et al., 2008). COSTA et al. (2008b) relata que o óleo essencial da *Guatteria hispida* é constituído por 70,52% de monoterpenos. VALTER et al., (2008) salienta que a presença de sesquiterpenos não é comum em espécies do Cerrado, por características próprias do bioma, porém esse aspecto não foi observado no óleo essencial da *C. calophyllum*.

O composto majoritário em todo o período analisado foi o sesquiterpeno oxigenado espatulenol (Apêndice A), chegando a representar aproximadamente 28% da amostra no mês de março/2014. Outro componente que se destacou foi o viridiflorol que, assim como o espatulenol esteve presente no óleo essencial em todos os meses analisados, as maiores concentrações desse composto se deram nos meses de menor teor de óleo essencial. O germacreno-D teve aumento gradativo das suas concentrações ao longo do período analisado, atingindo a maior concentração no mês de outubro/14, que correspondeu a 15,6% dos componentes do óleo essencial. Compostos como criptona, β -elemeno, cariofileno, aloaromadendreno, humuleno, *ent*-espatulenol, τ -cadinol e acetato de (-) isolongifolol também estiveram presentes em todos os meses analisados, porém em baixas concentrações. Segundo STEFANELLO et al. (2010), compostos cuja representação de área seja menor que 8% são considerados compostos minoritários.

Entre os meses de abril a agosto/14 foram observados os menores índices de pluviosidade na cidade de Rio Verde, fato que possivelmente influenciou nas variações qualitativas do óleo essencial de *C. calophyllum*. Os sesquiterpenos cariofileno (4,21%), aloaromadendreno (2,54%), humuleno (1,85%), β -elemeno (2,21%) e α -bulneseno (4,09%) tiveram os maiores teores relativos no mês de setembro, que apresentou simultaneamente baixa umidade relativa do ar (50%), pouca precipitação (50 mm) e temperatura média amena (em torno de 23°C). A síntese do (Z,E) farnesol parece ser diretamente influenciada pela disponibilidade hídrica, durante o período seco o composto não foi identificado e se tornando presente nos meses com maior precipitação. O oposto aconteceu com o sesquiterpeno elemol, sendo identificado no período de menor precipitação e não estando presente no óleo essencial no período chuvoso. Os

sesquiterpenos foram predominantes em todo o período analisado, os teores de espatulenol foram maiores no período de menor precipitação, o inverso foi observado para o germacreno-D, os maiores teores relativos foram observados nos meses de maior precipitação, que coincidiu com os períodos de floração e frutificação da espécie. Segundo MORAIS (2009) o estresse hídrico altera a fisiologia do vegetal em vários aspectos, o que conseqüentemente altera o metabolismo secundário, favorecendo o aumento ou a diminuição da síntese de constituintes químicos da planta. Há relatos na literatura de que o estresse hídrico geralmente induz aumento na produtividade de alguns terpenoides e redução de outras classes de compostos.

Outro fator que possivelmente está associado às variações dos componentes químicos e o teor do óleo essencial é o estágio fenológico da planta. Segundo MORAIS (2009) a idade e o estágio de desenvolvimento da planta podem influenciar não apenas a qualidade total de metabólitos secundários produzidos como também a proporção relativa dos compostos. Nos meses de setembro a novembro a *C. calophyllum* se encontrava em pleno florescimento, podendo estimular a síntese de determinados compostos e/ou diminuir a produção de outros. As maiores concentrações relativas de germacreno-D (15,06%) e germacreno-B (9,88%) foram observadas no mês de outubro/14, pico da floração da espécie. CASTRO et al. (2006) e SOUZA et al. (2007) atribuem ao germacreno-D a atração de polinizadores, pois o seu esqueleto químico imita feromônios sexuais de insetos, explicando o aumento da concentração do composto nesse período. Para o viridiflorol, não foram observados grandes variações no teor relativo, apenas leve decréscimo nos estados reprodutivos da *C. calophyllum*. Segundo GOBBO-NETO e LOPES (2007), o estágio fenológico da planta é de considerável importância podendo influenciar a quantidade total de metabólitos produzidos e suas proporções relativas. SANTANA (2013) observou que o estágio de desenvolvimento da *Baccharias reticularia* interfere na síntese do óleo essencial, durante a floração da espécie houve considerável aumento no teor do óleo essencial. Para a *C. calophyllum* foi observado comportamento semelhante, os maiores teores de óleo foi observado durante a floração e frutificação da espécie, vindo a reduzir durante a senescência.

MORAIS (2009) e GOBBO-NETO e LOPES (2007) citam que os fatores bióticos e abióticos estão intimamente relacionados e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário, tais como desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros.

A interação desses fatores é provavelmente ainda mais expressiva em plantas silvestres, como é o caso da *C. calophyllum*, cuja ocorrência está associada a ambientes naturais em que não se consegue isolar determinados fatores de influência. As variações obtidas no presente trabalho são, portanto, indicativos de que condições ambientais, tais como precipitação, umidade, estágio fenológico, interações com polinizadores e predadores, estão atuando sobre o metabolismo da planta possivelmente de forma conjunta e não homogênea, alterando a síntese de alguns metabólitos.

Tabela 2 Composição química do óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* coletadas em área típica de Cerrado, na cidade de Rio Verde-GO, em diferentes épocas (março/14 a janeiro/15).

Composto	IR	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro
MONOTERPENOS OXIGENADOS												
cis- β -Ocimeno	1007	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-
Linalol	1053	-	0,10	-	-	-	-	0,09	-	-	0,07	0,07
Ácido octanoico	1124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08	0,15
Criptona	1140	0,43	0,34	0,31	0,25	0,18	0,24	0,31	0,58	0,34	0,13	0,09
Isocitronelol	1199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06
Dióxido de limoneno	1209	-	0,23	-	-	0,12	0,20	0,14	0,35	0,17	0,07	0,04
SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS												
δ -elemeno	1298	-	0,46	0,63	0,63	0,64	0,76	0,76	1,11	0,74	0,69	0,52
α -cubebeno	1311	-	0,06	-	-	-	-	0,08	-	-	0,11	0,09
α -ilangeno	1334	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	-
Copaeno	1339	0,17	0,41	-	0,24	0,32	0,24	0,31	0,20	0,87	0,51	0,49
α -bourboneno	1348	-	-	-	-	0,10	0,12	0,16	0,51	-	0,09	0,08
β -Cubebeno	1354	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-
β -elemeno	1356	0,22	0,65	0,67	0,75	0,53	0,73	2,21	0,77	0,59	0,57	0,46
α -gurjuneno	1364	-	0,12	-	-	0,11	0,15	-	-	-	0,08	0,08
Cariofileno	1384	1,03	2,28	2,59	0,82	2,91	2,31	4,21	2,23	3,79	2,56	2,34
Aloaromadendreno	1404	0,84	1,20	1,30	1,37	1,30	0,90	2,54	0,84	0,77	1,12	0,92
Humuleno	1419	0,44	0,64	0,72	1,13	1,16	0,65	1,85	0,64	0,88	0,70	0,68
α -guaieno	1426	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,42	0,48
β -copaeno	1443	0,76	0,96	0,86	1,06	1,03	0,76	0,99	0,75	0,91	1,74	1,43
Germacreno-D	1448	0,43	3,80	4,97	4,82	5,62	9,05	7,56	15,60	12,47	6,71	7,30
β -selineno	1453	0,38	-	-	0,53	0,46	0,15	0,37	-	-	-	-
Viridifloreno	1462	1,08	1,38	-	1,67	1,66	-	1,53	-	-	2,10	2,03
Germacreno-B	1464	-	2,12	4,74	1,63	2,01	5,17	3,87	9,88	6,07	1,72	2,40
α -muroleno	1468	0,21	0,32	-	0,34	0,36	0,35	-	-	0,29	0,57	0,57
α -bulneseno	1472	-	0,23	-	0,39	0,47	0,42	4,09	0,57	0,49	0,28	0,30
γ -muroleno	1481	0,74	0,77	-	0,85	0,81	0,69	0,76	0,44	0,80	1,16	1,04

δ-cadineno	1491	0,62	0,72	-	0,77	0,89	0,72	0,88	0,73	1,03	1,47	1,45
Guaia-1(10),11- dieno	1523	-	0,61	1,07	-	-	1,22	1,07	2,47	1,27	1,11	0,95

SESQUITERPENOS OXIGENADOS												
---------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Espatulenol	1544	28,78	27,34	27,93	22,34	21,47	23,78	18,60	21,09	17,74	16,81	15,97
Viridiflorol	1550	9,99	10,65	10,30	10,93	10,27	8,73	8,25	6,02	7,23	9,25	8,79
Champacol	1559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,05
Elemol	1560	0,76	0,97	-	1,11	0,99	0,57	-	-	-	-	-
β-eudesmol	1567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,79
Óxido de cariofileno	1575	1,99	1,09	1,07	1,65	1,47	0,77	1,14	-	-	-	-
Cubenol	1583	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-epi-cubedol	1585	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-
<i>Enth</i> -espatulenol	1593	2,10	1,16	1,40	2,09	2,05	1,88	1,58	2,25	1,62	1,93	1,80
τ-cadinol	1605	1,58	2,88	2,61	3,40	3,30	2,56	3,10	1,79	3,93	5,95	5,71
Torreiol	1609	-	1,10	0,99	1,35	1,36	-	-	-	1,34	1,66	1,61
Acetato de (-) isolongifolol	1617	5,06	4,86	4,55	6,69	6,54	4,44	5,98	2,78	5,44	7,50	7,87
6-epi-shiobunol	1632	-	-	-	-	-	4,97	-	-	-	-	-
(Z,E) farnesol	1634	6,51	-	-	-	-	-	2,45	1,70	1,98	4,30	-
Óxido 1 de aloaromadendrene	1643	-	-	-	-	-	-	-	-	1,01	0,38	0,52
Óxido 2 de aromadendreno	1692	1,68	-	-	-	-	1,10	-	-	-	-	-
1-heptatriacontanol	1679	-	-	-	-	-	-	0,95	-	-	-	-
Epóxido de isoaromadendreno	1735	-	-	1,10	0,96	-	1,19	0,67	0,70	0,85	-	-
Tumbergol	1797	-	-	-	-	-	0,58	-	0,42	-	-	-
Andrografolide	1818	-	-	-	0,67	-	-	-	-	-	-	-

2.4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho revelaram a existência de diferenças na composição química e no rendimento de óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* em função da sazonalidade. O teor de óleo essencial variou significativamente no decorrer do período analisado, sendo os menores teores obtidos de março a agosto de 2014, e os teores mais elevados entre setembro de 2014 a janeiro de 2015. Os compostos majoritários identificados nas folhas de *C. calophyllum*, espatulenol, viridiflorol e germacreno-D estiveram presentes no óleo essencial em todo o período analisado, porém as suas proporções relativas variaram, acredita-se pela influência de fatores abióticos. Os compostos minoritários presentes no óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* em todo o período estudado foram criptona, β -elemeno, cariofileno, aloaromadendreno, humuleno, *ent*-espatulenol, τ -cadinol e acetato de (-) isolongifolol. Os sesquiterpenos cariofileno, aloaromadendreno, humuleno, β -elemeno e α -bulneseno tiveram os maiores teores relativos, em combinação de baixa umidade relativa do ar, pouca precipitação e temperatura média amena. O (Z,E) farnesol e o elemol sofreram influência da disponibilidade hídrica.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream: Illinois, 2007. 4v.

ANDRADE, A. M.; GOMES, S. S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 181-189, 2000. Disponível em: < <http://bit.ly/1fio3Gg>>. Acesso em: 22 mai. 2015.

ANDRADE, M. A.; et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividade antioxidante e antibacterina. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1GQmtWs>>. Acesso em: 17 mai 2015.

BARROS, F. M. C.; et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN (VERBENACEAE). **Química Nova**,

São Paulo, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009. Disponível em: <<http://bit.ly/1HVBYY0b>>. Acesso em: 22 mai. 2015.

BOTREL, P. P.; et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010. Disponível em: <<http://bit.ly/1CevFid>>. Acesso em: 13 mai. 2015. doi: 10.4025/actasciagr.32i3.3415.

CASTRO, D. P.; et al. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006. Disponível em:<<http://bit.ly/1w3jtQb>>. Acesso em: 16 nov. 2014.

CERQUEIRA, M. T.; et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009. Disponível em: <<http://bit.ly/1Bkad0m>>. Acesso em: 13 mai. 2015. doi: 10.1590/S0100-40422009000600035.

COSTA, V. C. O.; et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 245-248, 2008a. Disponível em: <<http://bit.ly/1LgvQSk>>. Acesso em: 24 mai. 2015. doi: 10.1590/S0102-695X2008000200019.

COSTA, E. V.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatterioopsis* species. **Phytochemistry**, Amsterdã, v. 69, n. 1, p. 1895-1899, 2008b. Disponível em: <<http://bit.ly/1G5rqXx>>. Acesso em: 15 nov. 2014. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.03.005.

COSTA, M. da S. **O vetor da dengue como objeto de atuação dos agentes de vigilância ambiental e de pesquisas com plantas inseticidas do Cerrado, em Tangará da Serra, MT**. 2011. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Curso de Pós Graduação em Ciências Ambientais, Universidade do Estado de Mato Grosso.

COSTA, M. da S.; et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 184-190, 2013. Disponível em: < <http://bit.ly/1ytzzRk>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

ELIAS, M. A. S; et al. Reproductive success of *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae) treelets in fragments of Brazilian savanna. **Journal of Tropical Ecology**, Winchelsea, v. 28, n. 1, p. 317-320, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1H1g4tE>>. Acesso em: 11 nov. 2014. doi: 10.1017/S0266467412000120.

FONSECA, M. C. M; et al. Influência da época e do horário de colheita nos teores de óleo essencial e de taninos em couve-cravinho (*Porophyllum ruderale*) (Jacq.) Cassini. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 75-79, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1IlGqRJ>>. Acesso em: 22 mai. 2015.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1J53V7i>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

LIMA, H. R. P.; et al. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003. Disponível em: < <http://bit.ly/1Bp52vT>>. Acesso em: 22 mai.2015.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 27, n. 2, suplemento – CD Rom, 2009. Disponível em: < <http://bit.ly/1RaUF0w>>. Acesso em: 17 mai. 2015.

NAGÃO, E. O.; et al. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., quimiotipo citral-limoneno. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2004. Disponível em: < <http://bit.ly/1J5ao2i>>. Acesso em: 16 mai. 2015.

NASCIMENTO, F. C. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003. Disponível em: <<http://bit.ly/1ys6D1d>>. Acesso em: 11 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-40422003000300006.

PAULUS, D.; et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 203-209, 2013. Disponível em: <<http://bit.ly/1Bk8NCV>>. Acesso em: 12 mai. 2015. doi: 10.1590/S0102-05362013000200005.

SANTANA, H. C. D. **Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal**. 2013. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília.

SILVA, N. A.; et al. Caracterização química do óleo essencial de erva cidreira (*Lippia Alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006. Disponível em: <<http://bit.ly/1G5hqhc>>. Acesso em: 12 mai. 2015.

SIQUEIRA, C. A. T.; et al. Chemical constituents of the volatileoil from leaves of *Annona coriácea* and in vitro antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 33-40, 2011. Disponível em:<<http://bit.ly/1CWtwg7>>. Acesso em: 16 nov. 2014. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000004.

SOUZA, T. J. T.; et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007. Disponível em: <<http://bit.ly/1ADMVBU>>. Acesso em: 29 mai. 2015. doi: 10.1590/S0102-695X2007000300011.

STEFANELLO, M. E. A.; et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010. Disponível em: <

<http://bit.ly/1Lgwsr3>>. Acesso em: 13 abr. 2015. doi: 10.1590/S0102-695X2010000100017.

VALTER, J. L.; et al. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 3, p. 373-378, 2008. Disponível em: < <http://bit.ly/1yF8Uov> >. Acesso em 16 nov. 2014. doi: 10.1590/S0102-695X2008000300011.

CAPÍTULO III: Atividade tripanocida e citotóxica do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum*.

(Normas de acordo com a revista Ciência Rural)

RESUMO

Os produtos de origem natural têm apresentado atividade biológica e servem como fonte alternativa de agentes antiparasitários, uma vez que algumas drogas, atualmente empregadas para essa finalidade apresentam vários efeitos colaterais ou eficácia limitada. Nesse contexto este trabalho foi realizado com o intuito de determinar a atividade tripanocida e citotóxica dos óleos essenciais da *Cardiopetalum calophyllum*. A obtenção do óleo essencial foi realizada a partir de folhas, flores e frutos *in natura*, pela técnica de hidrodestilação utilizando um aparelho de cleveger. A atividade tripanocida foi avaliada sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, analisando a porcentagem de lise parasitária. A atividade citotóxica foi avaliada sobre fibroblastos e determinada pelo método do MTT. Os óleos essenciais de folhas, flores e frutos apresentaram $IC_{50} = 59,95; 48,75$ e $132,61 \mu\text{g mL}^{-1}$, e citotoxicidade menor que o benzonidazol, com $CC_{50} = 698,3; 220,3$ e $150,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A eficácia do óleo essencial de flores e folhas é considerada moderada no combate ao *T. cruzi*.

Palavras-chave: Óleos voláteis, citotoxicidade, *Trypanosoma cruzi*, benzonidazol.

CHAPTER III: Trypanocide and cytotoxic activity of the essential oil of *Cardiopetalum calophyllum*.

(Standards in accordance with the Rural Science magazine)

ABSTRACT

Natural products have biological activity and serve as an alternative source of antiparasitic agents, since some drugs currently used for this purpose have various side effects or limited efficacy. In this context this study was conducted in order to determine the trypanocidal and cytotoxic activity of essential oils from *Cardiopetalum calophyllum*. The essential oil was from leaves, flowers and fruits in natura, and were obtained by hydrodistillation technique using a clewenger apparatus. The trypanocidal activity was evaluated on trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, analyzing the percentage of parasite lysis. The cytotoxic activity was evaluated on fibroblasts and determined by the MTT method. The essential oils of leaves, flowers and fruits showed $IC_{50} = 59.95; 48.75$ and $132.61 \mu\text{g mL}^{-1}$ and less cytotoxicity than benznidazole with $CC_{50} = 698.3; 220.3$ and $150.9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The effectiveness of the essential oil of flowers and leaves is considered moderate in the fight against *T. cruzi*.

Keywords: Volatile oils, cytotoxicity, *Trypanosoma cruzi*, benznidazole.

3.1. INTRODUÇÃO

A *Cardiopetalum calophyllum* é uma espécie pertencente à família Annonaceae, sendo encontrada em região de Cerrado e Floresta Amazônica. Relatos na literatura (SEGUINEAU et al. 1991) descrevem a presença de alcaloides isoquinolínicos na casca do caule, e estes quando testados por RINALDI (2007) demonstraram forte atividade inseticida e citotóxica. Outras atividades biológicas como leishmanicida e tripanocida do extrato alcaloídico de folhas de *C. calophyllum* também foram descritas por FOURNET et al. (1994).

A Tripanosomíase Americana, também conhecida como doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, sendo endêmica em 21 países das Américas, segundo a Organização Mundial da Saúde (2014) afeta cerca de 6 a 8 milhões de pessoas, com 28 mil novos casos a cada ano. Nas últimas décadas tem sido diagnosticada nos Estados Unidos, Canadá e em países europeus e do Pacífico Ocidental (GOMES e FAVERO, 2011). Segundo o Ministério da Saúde (2010) a doença de Chagas é uma doença negligenciada, pois prevalece em condições de pobreza e contribui para a manutenção do quadro de disparidades sociais, já que representa uma barreira ao desenvolvimento dos países.

O tratamento da doença de Chagas é um desafio para a maioria dos países, inclusive o Brasil. A falta de interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos tratamentos faz com que as doenças negligenciadas sejam tratadas com medicamentos pouco eficazes ou com alta toxicidade aguda (MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Atualmente apenas duas drogas são usadas para o tratamento da doença de Chagas, sendo que no Brasil só é disponível

o benzonidazol, que possui alta toxicidade e ineficácia na fase crônica da doença (SILVEIRA et al, 2000; COURA et al., 1997).

Nos últimos anos as pesquisas com produtos de origem natural têm tido resultados animadores com relação à atividade antiparasitária *in vitro*, despontando como potenciais substâncias para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias, com menos efeitos colaterais e maior eficácia do tratamento (ANDRADE, 2013). SANTORO et al. (2007) avaliaram o efeito tripanocida do óleo essencial de *Achillea millefolium*, *Syzygium aromaticum* e *Ocimum basilicum* sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, e os menores valores de IC₅₀ (concentração de inibição do crescimento parasitário em 50%) foram para o óleo *Syzygium aromaticum* (99,5 e 57,5 µg mL⁻¹ para epimastigotas e tripomastigotas respectivamente).

Em outro estudo, BORGES et al. (2012), avaliaram o efeito tripanocida e citotóxico de óleos essenciais de plantas medicinais (*Lippia sidoides*, *Lippia origanoides*, *Ocimum gratissimum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Vitex agnus-castus* e *Justicia pectorales*) do nordeste brasileiro sobre o *T. cruzi*. O óleo essencial de *C. ambrosioides*, *L. origanoides* e *L. sidoides* apresentaram os melhores resultados contra a forma epimastigota, com IC₅₀ de 21,3; 26,2 e 28,9 µg mL⁻¹ respectivamente. Para a forma tripomastigota os melhores resultados foram encontrados com os óleos de *L. sidoides*, *O. gratissimum*, *C. ambrosioides* e *L. origanoides*, com IC₅₀ de 10,3; 11,5; 28,1 e 39,7 µg mL⁻¹ respectivamente. Segundo os autores o efeito tripanocida dessas espécies possivelmente se deve ao fato de possuírem o carvacrol e o timol como componentes majoritários dos óleos essenciais.

Em trabalho de revisão, SAÚDE-GUIMARAES e FARIA (2007) relatam uma série de compostos naturais que possuem atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, presentes em óleos essenciais, o ácido caurenico, isolado de *Mikania obtusata* e de *Xylopiya frutescens* apresentou 100% de atividade contra *T. cruzi* na concentração de 1000 µg mL⁻¹; o ácido *ent-9α*-hidroxi-15β-E-cinnamoiloxi-16-cauren-19-oico isolado de *Mikania stipulacea* e *Mikania hoehnei* reduziu o número de parasitas no sangue contaminado em 61,7, 62,8 e 69,4% nas concentrações de 100, 250 e 500 µg mL⁻¹. O *ent-12R*-hidroxilabda-7,13-dien-15,16-olídeo isolado de *Alomia myriadenia* se mostrou ativo, causando a lise de 100% dos tripomastigotas na concentração de 250 µg mL⁻¹.

Este trabalho teve como finalidade avaliar a atividade tripanocida e citotóxica do óleo essencial extraído de folhas, flores e frutos da *Cardiopetalum calophyllum*.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano – *campus* Rio Verde.

3.2.2. Obtenção do material vegetal

As folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* foram coletadas nos meses de março, setembro e dezembro de 2014, respectivamente, no período da manhã, em área nativa de Cerrado na Universidade de Rio Verde – UniRV. O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal Goiano, e foram selecionadas folhas, flores e frutos completamente desenvolvidos, saudáveis, com ausência de injúrias e manchas provocadas por fitopatógenos, insetos ou insolação.

A espécie foi identificada pelos biólogos Odirlei Simões e Marcelo Nogueira e a exsiccata depositada no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, e se encontra depositada sob o registro 3815.

3.2.3. Extração do óleo essencial

O óleo foi obtido pelo processo de hidrodestilação, pelo período de 4 horas, segundo metodologia empregada por SIQUEIRA et al. (2011). O óleo essencial foi extraído com diclorometano, filtrado com sulfato de sódio anidro, o solvente removido por evaporação a temperatura ambiente e o óleo armazenado a -4 °C até o momento da análise da composição química e dos testes biológicos.

3.2.4. Avaliação da atividade citotóxica

Fibroblastos da linhagem LLCMK₂ foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (100 ml de soro) com 2,5 mL de estreptomicina e 2,5 mL de penicilina, em garrafas de

cultura a 37°C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%. O meio de cultura com as células foi transferido para um tubo fálcon estéril e centrifugado (1500 rpm a 4°C por 15 minutos). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e acrescentado 1 mL de RPMI para atingir a concentração final de 10⁶. Foi realizado um novo cultivo por 24 horas em estufa de CO₂, e em seguida foi feita a leitura das placas em leitor de ELISA a 517 nm, através da técnica colorimétrica pelo MTT.

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, as amostras foram avaliadas nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 e 6.25 µg mL em triplicata. Como controle positivo foi utilizado DMSO 25% e controle negativo DMSO a 0,5%.

3.2.5. Parasita

Foi utilizada a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, constituídas por formas tripomastigotas delgadas (NUSSENZWEIG, 1953). Esta cepa é mantida no Biotério da Universidade de Franca, através de repiques sucessivos em camundongos Swiss, por punção cardíaca no dia do pico parasitêmico (7º dia da infecção).

3.2.6. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* com sangue infectado

O ensaio foi realizado na Universidade de Franca – Franca/SP, utilizando sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7º dia da infecção). O sangue infectado foi diluído com solução fisiológica de forma a se obter a concentração final de sangue com 10⁶ formas tripomastigotas/mL.

As amostras de óleos essenciais avaliadas foram diluídas em DMSO e alíquotas desta solução estoque foram adicionadas ao sangue infectado na placa de microtitulação (96 poços), totalizando um volume de 200 µL. Para a realização do ensaio tripanocida, as amostras foram avaliadas em triplicata nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12.5 µg mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizado o benzonidazol e como controle negativo DMSO a 0,5%. A microplaca foi incubada a 4°C por 24 horas, após este período, a atividade foi verificada quantitativamente, através da contagem das formas tripomastigotas, segundo técnica empregada por BRENER (1962) e determinação da porcentagem de lise parasitária, através da comparação com o grupo de controle sem tratamento.

3.2.7. Análise estatística

A análise estatística utilizada foi análise de variância (ANOVA) pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.0).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Atividade tripanocida

Observa-se que os óleos essenciais analisados apresentam efeito inibitório sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, ocorreu aumento da inviabilidade de células tripomastigotas com o aumento da concentração do óleo essencial das folhas, flores e frutos (Tabela 1), sendo a melhor atividade obtida com o óleo essencial extraído das flores (IC_{50} 48,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguido pelo óleo essencial extraído das folhas (IC_{50} 59,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do óleo extraído dos frutos (IC_{50} 132,61 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Segundo ANDRADE (2013) quanto menor o valor do IC_{50} mais ativo é o óleo analisado frente ao parasita.

Relatos da atividade tripanocida do óleo essencial de *C. calophyllum* não foram encontrados após revisão de literatura. O extrato hexânico da casca do caule de *C. calophyllum*, exibiu atividade tripanocida com IC_{50} de 60,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MESQUITA et al., 2005), valor esse próximo ao encontrado para o óleo extraído das folhas. FOURNET et al. (1994) avaliaram diversos extratos de folhas e casca do caule, encontrando atividade para o extrato alcaloídico a partir de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os extratos etanólicos, acetato de etila e etéreo não inviabilizaram os parasitas nas concentrações testadas, os óleos essenciais das folhas, flores e frutos apresentaram inviabilidade celular em concentrações menores (Tabela 1) que a encontrada por FOURNET et al. (1994).

Tabela 1: Atividade tripanocida do óleo essencial da *C. calophyllum* extraído das folhas, flores e frutos sobre a forma tripomastigota.

Substâncias	% de lise \pm D.P. / Concentração ($\mu\text{g/mL}$)					IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) *
	200	100	50	25	12,5	
FO	76,5 \pm 3,6	62,9 \pm 3,7	48,1 \pm 2,4	23,4 \pm 2,1	20,9 \pm 1,5	59,95
FL	64,1 \pm 1,7	53,0 \pm 2,9	51,8 \pm 3,1	41,9 \pm 2,5	18,5 \pm 1,4	48,75
FR	69,1 \pm 3,1	49,3 \pm 2,4	40,7 \pm 2,0	33,3 \pm 1,3	25,9 \pm 1,9	132,61
BZ						9,8

FO	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	90,7±1,7	698,3
FL	100±0	100±0	100±0	100±0	95,3±0,8	50,3±0,9	23,3±1,9	220,3
FR	100±0	85,2±1,8	80,3±1,5	72,9±1,7	42,8±1,1	35,6±1,4	30,7±1,7	150,9
BZ	147,37							

*CC₅₀: concentração que causa lise ou morte em 50% das células de *T. cruzi* na forma tripomastigota. FO = folhas; FL = flores; FR = frutos; BZ = benzonidazol; D.P. = desvio padrão

Alguns estudos são desenvolvidos na tentativa de determinar a citotoxicidade de vários compostos extraídos de plantas, MEDEIROS et al. (2011) reportam a baixa citotoxicidade do óleo essencial de *Lippia sidoides* frente a macrófagos quando comparado com o timol, o óleo essencial da *L. sidoides* possui CC₅₀ de 217, 28 µg mL⁻¹ frente a CC₅₀ de 37,41 µg mL⁻¹ do timol. Segundo ANDRADE (2013) quanto menor o valor do CC₅₀ mais citotóxico é o composto avaliado frente à linhagem celular utilizada. O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou baixa citotoxicidade e maior atividade tripanocida quando comparado ao controle, timol. BORGES et al. (2012) avaliaram a toxicidade de plantas do nordeste brasileiro em macrófagos e a sua ação tripanocida, *Vitex agnus-castus* foi a espécie que apresentou a menor citotoxicidade com CC₅₀ de 617,9 µg mL⁻¹. ANDRADE (2013) avaliou a citotoxicidade do óleo essencial de *Cinnamodendron dinisii* e de *Siparuna guianensis*, obtendo os CC₅₀ de 35,72 e de 38,01 µg mL⁻¹ respectivamente, frente a células VERO, sendo considerados citotóxicos. ZAPATA et al. (2010) analisaram a citotoxicidade do óleo essencial de *Baccharis latifolia* e *Achyrocline alata*, concluindo que não são tóxicos para células VERO. SASSI et al (2008) não observaram citotoxicidade para o óleo essencial de *Chrysanthemum trifurcatum*, que apresentou CC₅₀ de 735,9 µg mL⁻¹.

A atividade citotóxica do óleo essencial obtido de folhas, flores e frutos de *C. calophyllum* não foi descrita em estudos anteriores. PERÉS et al. (2009) atribuem a citotoxicidade de *Piper gaudichauanum* a alta proporção de sesquiterpenos que constituem o seu óleo essencial, cerca de 87,6%, o efeito citotóxico observados em fibroblastos tratados com o óleo essencial foi dose dependente, a inviabilidade celular era observada a partir da concentração de 0,5 µg mL⁻¹. Esse mesmo efeito, não foi observado com óleo essencial de *C. calophyllum*, que é composto predominantemente por sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados frente aos monoterpenos.

3.4. CONCLUSÕES

A atividade tripanocida do óleo essencial extraído de folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* para as formas tripmastigota foram de $IC_{50} = 59,95; 48,75$ e $132,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. O óleo essencial de flores e folhas apresentaram atividade tida como moderada, porém menor que a do benzonidazol ($IC_{50} = 9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entretanto a atividade citotóxica dos óleos essenciais avaliados foi menor que a do benzonidazol, o óleo das folhas, flores e frutos apresentaram CC_{50} de $698,3; 220,3$ e $150,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. No presente estudo, foi demonstrado que os óleos essenciais extraído das folhas e flores da *C. calophyllum* possuem moderada atividade tripanocida e baixa atividade citotóxica, quando comparados com o benzonidazol, medicamento de referência no Brasil para o tratamento da doença de Chagas. Dessa maneira, futuramente o óleo essencial da *C. calophyllum* pode vir a ser utilizado como um aliado ao tratamento da doença de Chagas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. A. **Óleos essenciais de Cinnamodendron dinisii Schwacke e Siparuna guianensis Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico.** 2013. 227p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Curso de Pós Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras.

BORGES, A. R.; et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, Atlanta, v. 132, n. 1, p. 123-128, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1Km0Q2Y>>. Acesso em 13 jun. 2015.

BRENNER Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 389-396, 1962.

COURA, J. R.; et al. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. avaliação preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 2, p. 139-144, 1997. Disponível

em: < <http://bit.ly/1RHKQaN>>. Acesso em: 22 mai. 2015. doi: 10.1590/S0037-8682199700020009.

FOURNET, A.; et al. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Atlanta, v. 41, n. 1, p. 19-37, 1994. Disponível em: < <http://bit.ly/1STxtqr>>. Acesso em 27 jun. 2015.

GOMES, S. P.; FAVERO, S. Avaliação de óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade inseticida em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Scientiarum Health Sciences**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 147-151, 2011. Disponível em: < <http://bit.ly/1IkN4Mr>>. Acesso em: 15 mai. 2015. doi: 10.4025/actascihealthsci.v33i2.9531.

LEITE, N. F.; et al. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013. Disponível em: < <http://bit.ly/1Lvkvgp>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

LIMA, J. P.; et al. Avaliação do potencial antiepipimastigota e citotoxicidade do citrionelol. **Caderno de Cultura e Ciência**, Crato, v. 11, n. 1, p. 38-41, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1BMy5cN>>. Acesso em 24 jun. 2015.

MEDEIROS, M. G. F.; et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, Atlanta, v. 60, p. 237-241, 2011. Disponível em: < <http://bit.ly/1ebFdVt>>. Acesso em: 02 jun. 2015.

MESQUITA, M. L.; et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005. Disponível em: < <http://bit.ly/1Lvjo6G>>. Acesso em: 05 jun 2015.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 268-286, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1HoHbz8>>. Acesso em: 18 mai. 2015. doi: 10.5935/1984-6835.20120022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1TVOeCB>>. Acesso em 15 mai. 2015.

NUSSENZEWEIG, V.; et al. Ação de corantes trifenilmetâmicos sobre o *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de chagas por transfusão de sangue. **Hospital**, v. 44, p. 731- 744, 1953.

Organização Mundial de Saúde. Small bites big threats – Chagas. 2014. Disponível em < <http://bit.ly/1jtUwXi>>. Acesso em 30 jun 2015.

OTOGURO, K.; et al. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**, Atlanta, v. 72, p. 2024-2030, 2011. Disponível em: < <http://bit.ly/1JeRcw8>>. Acesso em: 23 jun. 2015.

PERÉS, V. F.; et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, Atlanta, v. 47, n. 9, p. 2389-2395, 2009. Disponível em: < <http://bit.ly/1fXbPmP>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** 2007. 125p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Curso de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo.

SANTORO, G. F.; et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, Atlanta, v. 116, n. 1, p. 283-290, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1eRbcei>>. Acesso em: 27 jun. 2015.

SANTOS, K. K. A.; et al. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* de *Mentha arvensis* e *Turnera ulmifolia*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de**

Plantas Medicinales y Aromáticas, Santiago, v. 11, n. 2, p. 147-153, 2012. Disponível em: < <http://bit.ly/1ICrSgM>>. Acesso em 23 jun. 2015.

SASSI, B.; et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of (Tunisian) *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. and Trab. flowerheads. **Comptes Rendus Chimie**, Atlanta, v. 11, n. 3, p. 324-330, 2008. Disponível em: < <http://bit.ly/1IkPafs>>. Acesso em 25 jun. 2015.

SAÚDE-GUIMARAES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 17, n. 3, p.455-465, 2007. Disponível em: < <http://bit.ly/1Km0Xvt>>. Acesso em: 08 jun. 2015. doi: 10.1590/S0102-695X2007000300021.

SÉGUINEAU, C.; et al. Isoquinoline alkaloids from *Cardiopetalum calophyllum*. **Planta Médica**, Alemanha, v. 57, n. 1, p. 581, 1991. Disponível em: < <http://bit.ly/1TVACaH>>. Acesso em 12 dez. 2014.

SILVEIRA, C. A. N.; et al. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 1, p. 191-196, 2000. Disponível em: < <http://bit.ly/1JqL4Up>>. Acesso em: 18 mai. 2015.

SIQUEIRA, C. A. T.; et al. Chemical constituents of the volatileoil from leaves of *Annona coriácea* and in vitro antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 33-40, 2011. Disponível em:<<http://bit.ly/1CWtwg7>>. Acesso em: 16 nov. 2014. doi: 10.1590/S0102-695X2011005000004.

ZAPATA, B.; et al. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de La família Asteraceae. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Atlanta v. 27, n. 2, p. 101-103, 2010. Disponível em: < <http://bit.ly/1JqMBtD>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CONCLUSÕES GERAIS

O óleo essencial das folhas, flores e frutos da *C. calophyllum* são formados pela mistura complexa de mono e sesquiterpenos, com predominância do último. Os constituintes majoritários foram o espatulenol (28,78%) no óleo essencial das folhas, o germacreno-D (37,03%) e germacreno-B (13,72%) nas flores e o germacreno-D (28,19%), germacreno-B (20,90%) e espatulenol (11,53%) no óleo dos frutos.

A interação da *C. calophyllum* com fatores abióticos resultou em diferenças na composição química e no rendimento de óleo essencial. O teor variou significativamente no decorrer do período analisado, sendo os menores teores obtidos de março a agosto de 2014, e os teores mais elevados entre setembro de 2014 a janeiro de 2015. Os compostos majoritários identificados nas folhas de *C. calophyllum*, espatulenol, viridiflorol e germacreno-D estiveram presentes no óleo essencial em todo o período analisado, porém as suas proporções relativas variaram, acredita-se, pela influência de fatores abióticos com a *C. calophyllum*. Os compostos minoritários presentes no óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* em todo o período estudado foram cryptone, β -elemeno, cariofileno, aloaromadendreno, humuleno, enthespatulenol, τ -cadinol e acetato de (-) isolongifolol. Os sesquiterpenos cariofileno, aloaromadendreno, humuleno, β -elemeno e α -bulneseno tiveram os maiores teores

relativos, em combinação de baixa umidade relativa do ar, pouca precipitação e temperatura média amena. O (Z,E) farnesol e o elemol sofrem influência da disponibilidade hídrica.

A atividade tripanocida para as formas tripmastigota do óleo essencial extraído das folhas, flores e fruto da *C. calophyllum* foram de $IC_{50} = 59,95; 48,75$ e $132,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. As flores e folhas apresentaram atividade tida como moderada, porém menor que a do benzonidazol ($IC_{50} = 9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entretanto a atividade citotóxica dos óleos avaliados, foram menor que a do benzonidazol, o óleo das folhas, flores e frutos apresentaram CC_{50} de $698,3; 220,3$ e $150,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. No presente estudo, foi demonstrado que os óleos essenciais extraído das folhas e flores da *C. calophyllum* possuem moderada atividade tripanocida e baixa atividade citotóxica, quando comparados com o benzonidazol, medicamento de referência no Brasil para o tratamento da doença de Chagas. Dessa maneira, futuramente o óleo essencial da *C. calophyllum* pode vir a ser utilizado como um aliado ao tratamento da doença de Chagas.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cromatograma dos óleos essenciais de folhas de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas entre março/14 e janeiro/15.

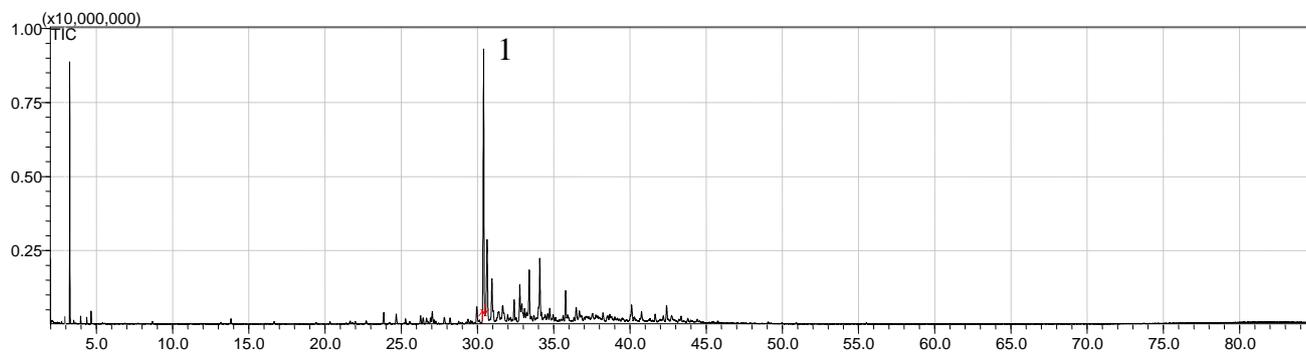


Figura 1A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em março/2014. 1 Espatuleno.

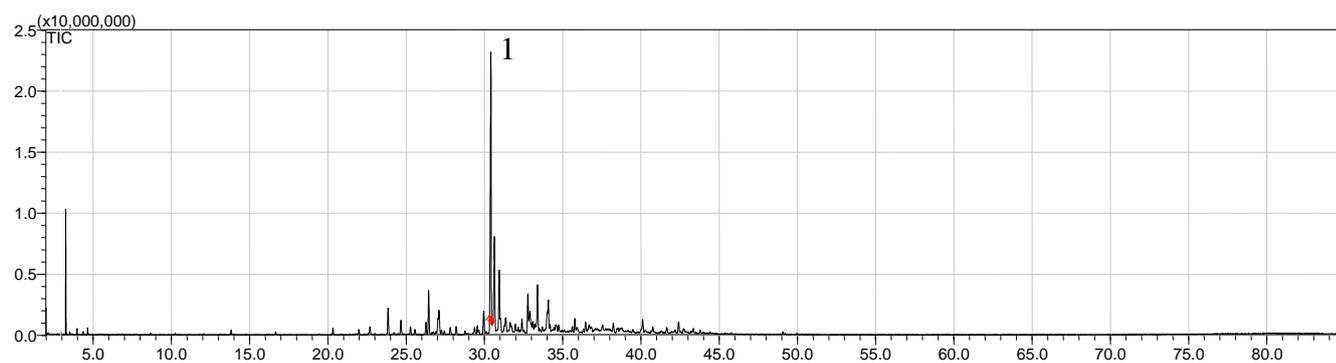


Figura 2A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em abril/2014. 1 Espatuleno.

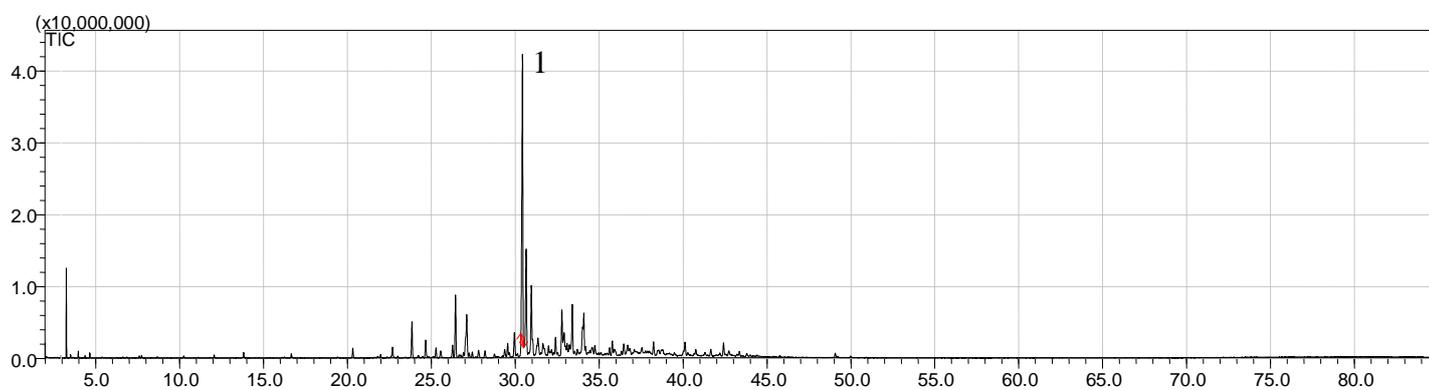


Figura 3A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em maio/2014. 1 Espatuleno.

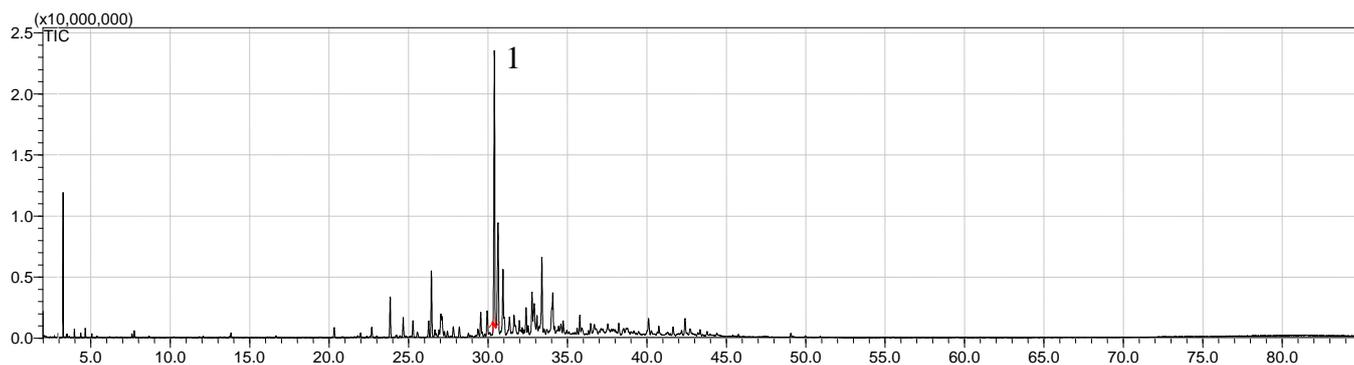


Figura 4A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em junho/2014. 1 Epatulenol.

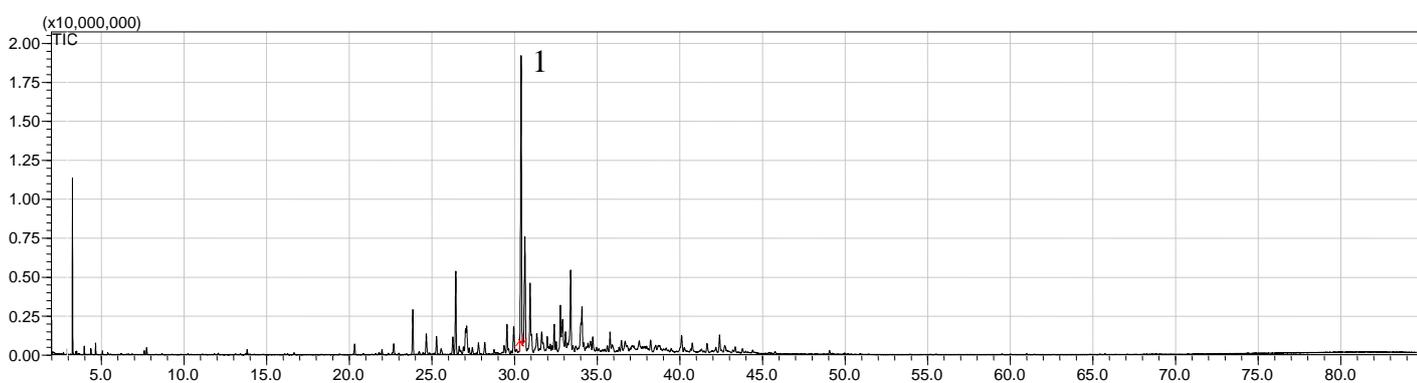


Figura 5A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em julho/2014. 1 Epatulenol.

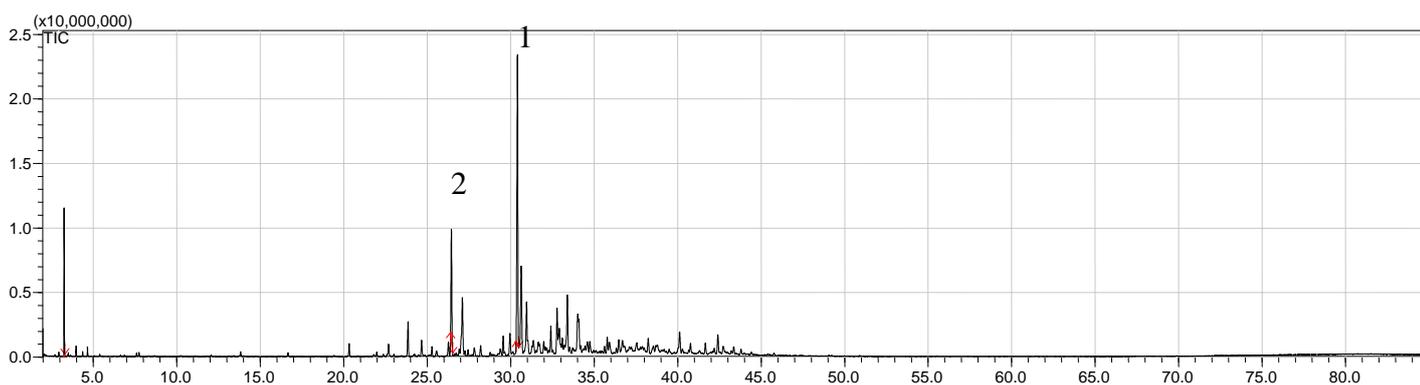


Figura 6A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em agosto/2014. 1 Epatulenol; 2 Germacreno-D.

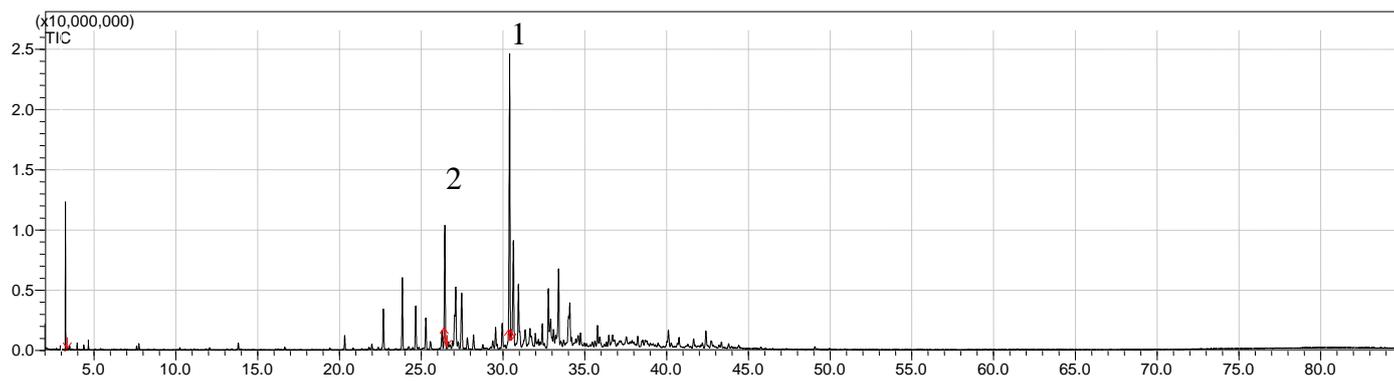


Figura 7A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em setembro/2014. 1 Espatuleno; 2 Germacreno-D.

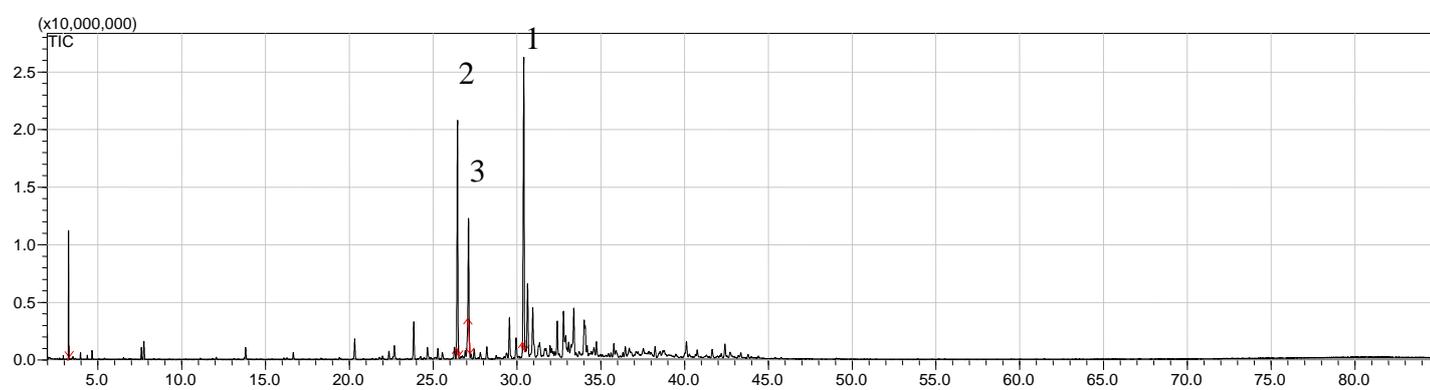


Figura 8A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em outubro/2014. 1 Espatuleno; 2 Germacreno-D; 3 Germacreno-B.

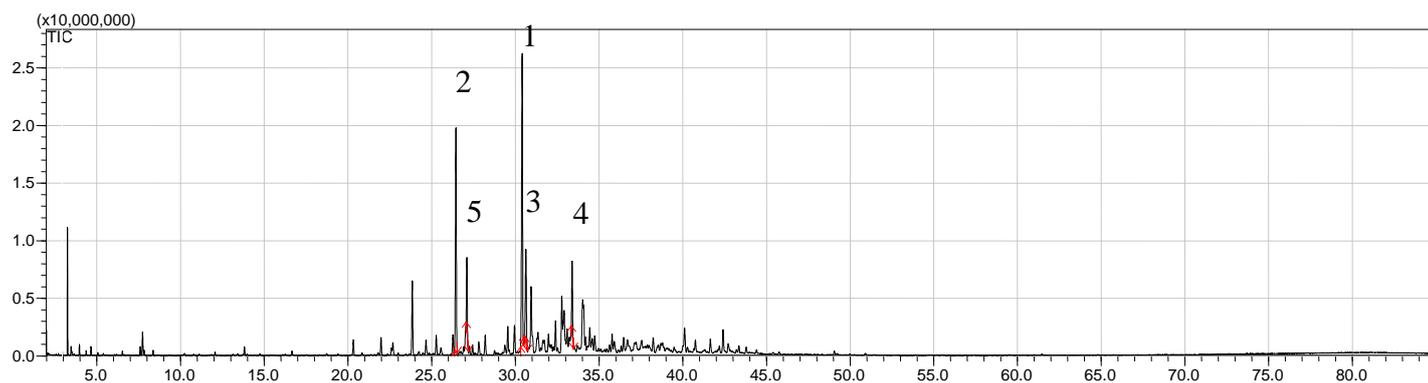


Figura 9A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em novembro/2014. 1 Espatuleno; 2 Germacreno-D; 3 Viridiflorol; 4 Acetato de (-) isolongifolol; 5 Germacreno-B.

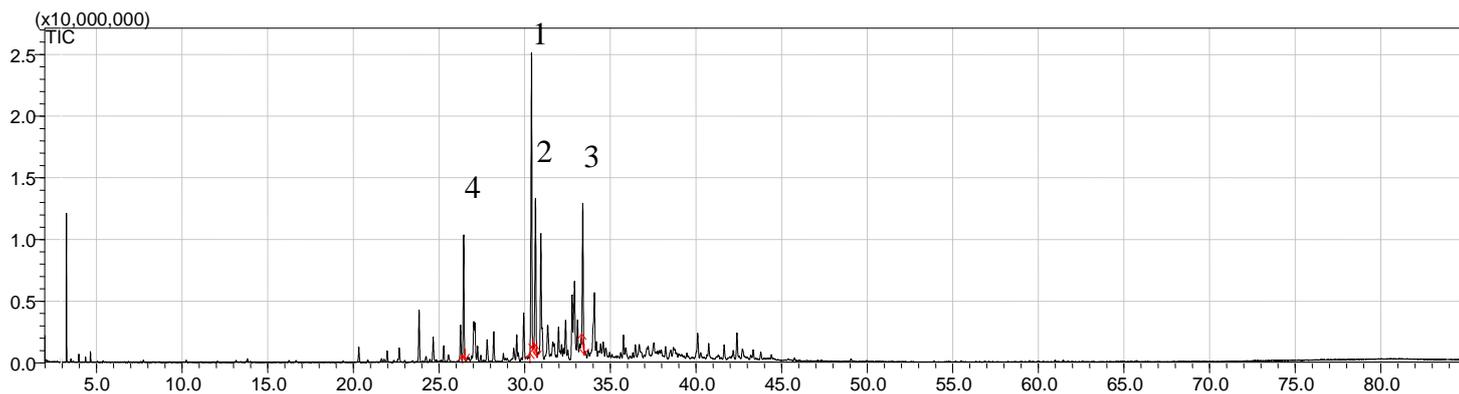


Figura 10A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em dezembro/2014. 1 Espatulenol; 2 Viridiflorol; 3 *Ent*-espatulenol; 4 Germacreno-D.

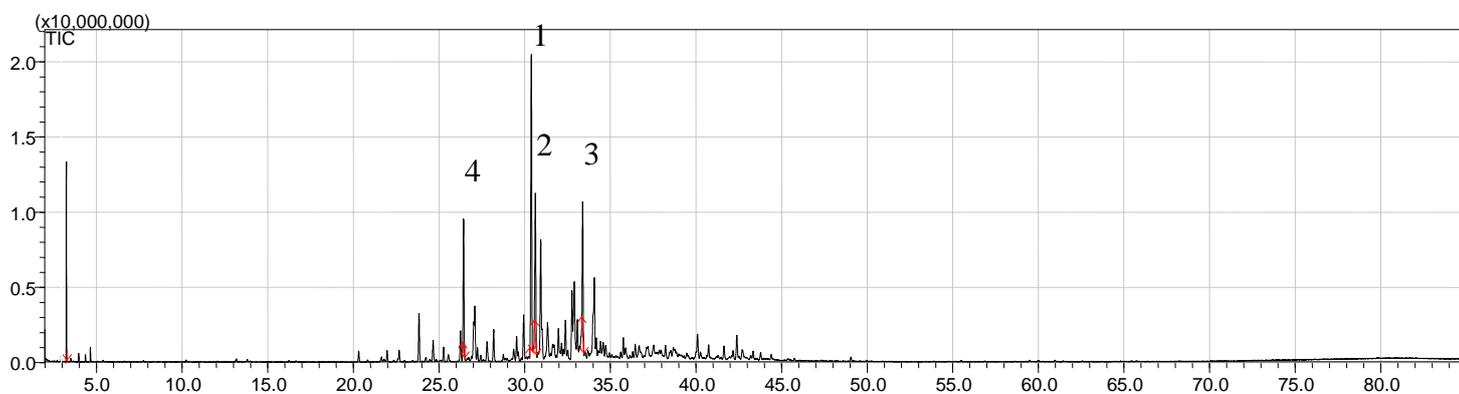


Figura 11A: Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em janeiro/2015. 1 Espatulenol; 2 Viridiflorol; 3 Acetato de (-) isolongifolol; 4 Germacreno-D.

APÊNDICE B – Cromatograma dos óleos essenciais de folhas, flores e frutos de *Cardiopetalum calophyllum*.

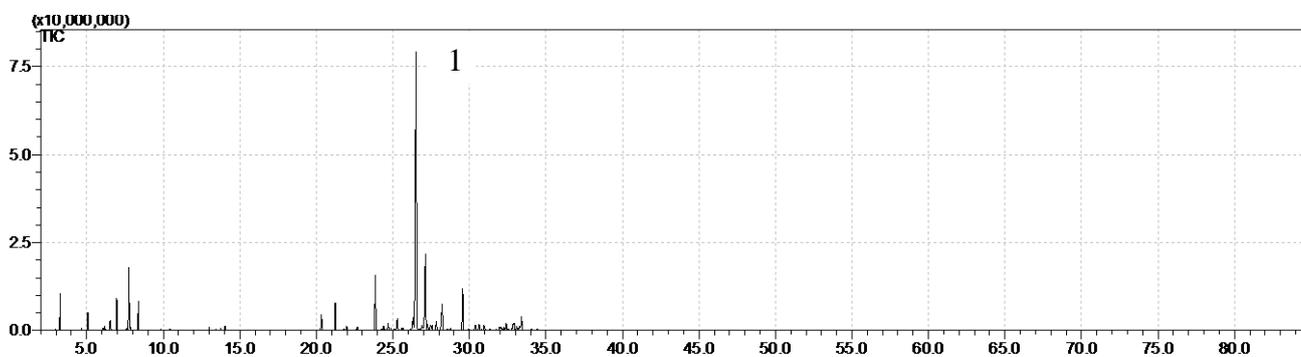


Figura 1B: Cromatograma do óleo essencial de flores de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em setembro/2014. 1 Germacreno-D

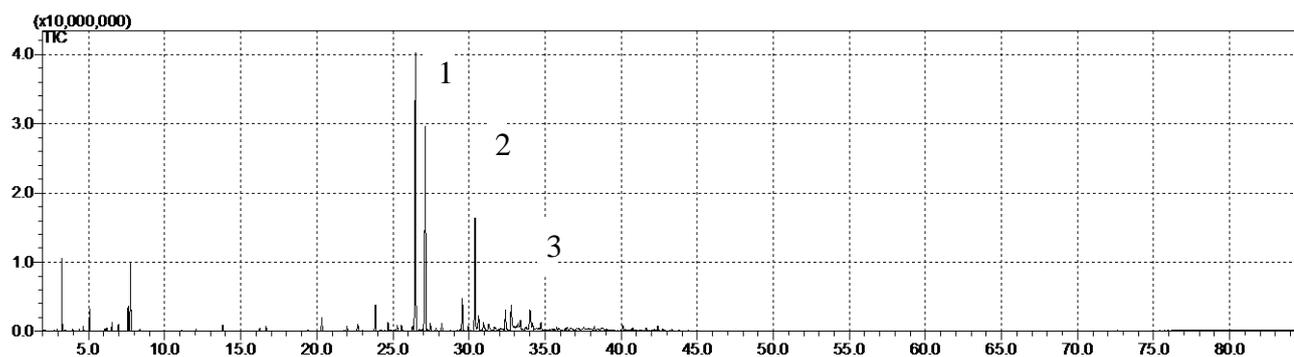


Figura 2B: Cromatograma do óleo essencial de frutos de *Cardiopetalum calophyllum* coletados em dezembro/2014. 1 Germacreno-D; 2 Germacreno-B; 3 Espatuleno.

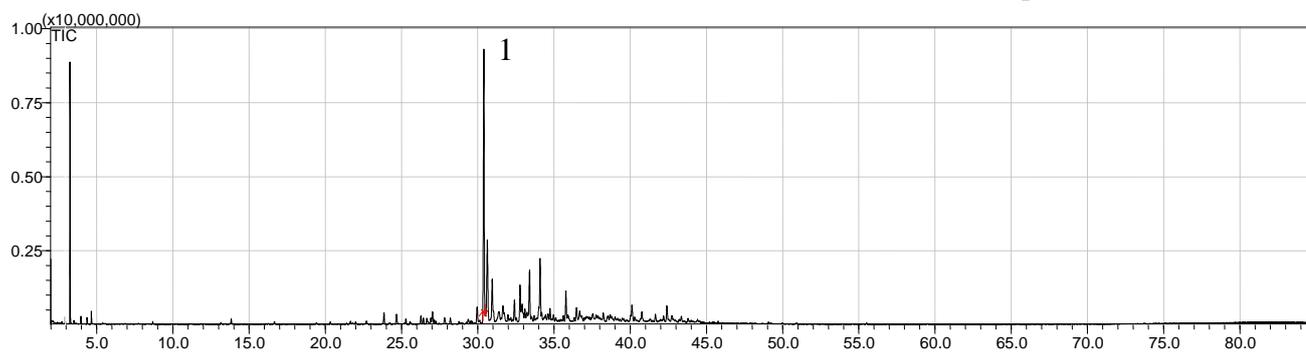


Figura 3B: Cromatograma do óleo essencial de folhas de *Cardiopetalum calophyllum* coletadas em março/2014. 1 Espatuleno.