

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

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FRUTOS VERDES
E MADUROS DE *Murraya paniculata* (L) Jack.

Autora: Flávia Fernanda Alves da Silva
Orientadora: Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves

RIO VERDE – GO
Agosto 2019

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

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FRUTOS VERDES
E MADUROS DE *Murraya paniculata* (L) Jack.

Autora: Flávia Fernanda Alves da Silva
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 Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO
Agosto 2019

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

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

Identificação da Produção Técnico-Científica

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

Nome Completo do Autor: Flávia Fernanda Alves da Silva

Matrícula: 20172033103I0010

Título do Trabalho: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FRUTOS VERDES E MADUROS DE *Murraya paniculata* (L) Jack.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 11/10/2019

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

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

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

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

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

Rio Verde-GO, 11/10/2019.
Local Data

Flávia Fernanda Alves da Silva

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

Carina P. F. Alves
Assinatura do(a) orientador(a)

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

SSI586
c Silva, Flávia Fernanda Alves da Silva
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FRUTOS VERDES E MADUROS
DE *Murraya paniculata* (L) Jack. / Flávia Fernanda
Alves da Silva Silva; orientadora Cássia Cristina
Fernandes Alves; co-orientador Mayker Lázaro Dantas
Miranda . -- Rio Verde, 2019.
75 p.

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

1. Produtos naturais. 2. murta de cheiro. 3. óleo
essencial. 4. composição química. 5. atividades
biológicas. I. Fernandes Alves, Cássia Cristina,
orient. II. Dantas Miranda , Mayker Lázaro , co-
orient. III. Título.


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


COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS
FOLHAS, FRUTOS VERDES E MADUROS DE *Murraya*
paniculata (L.) Jack

Autora: Flávia Fernanda Alves da Silva
Orientadora: Cassia Cristina Fernandes Alves

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 23 de agosto de 2019.


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


Prof. Dr. Mayker Lázaro Dantas
Miranda
Avaliador externo
IFTM/Campus Uberlândia


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

AGRADECIMENTOS

Sou grata, primeiramente ao meu Deus e melhor amigo! Pelo dom da vida e por seu infinito amor.

Aos meus pais, Maria do Socorro Alves da Silva e Luiz Carlos Alves da Silva, pelo amor incondicional. Sempre foram meus maiores incentivadores! Obrigada por todo amor, cuidado e orações. Vocês são meus exemplos de determinação, coragem e humildade, meu amor por vocês não tem fim.

Ao meu irmão, Mestre e Doutorando, Fábio Fernando Alves da Silva, pelo apoio durante todo período, obrigado pelas palavras que me confortavam e instruções que me ajudaram. Você é o cara!

Ao meu querido esposo Heliton de Oliviera Resende, obrigada pelo amor paciente e benigno. Pelas orações, abraços e palavras de determinação durante esse período.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Cássia Cristina Fernandes Alves, pela determinação, paciência, competência e incentivo, mas acima de tudo, por sua amizade! Sou muito grata a Deus por tê-la colocado em minha vida, seu exemplo de profissional e pesquisadora me contagiou e com toda certeza o levarei por toda vida.

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Mayker L. Dantas Miranda, que mesmo longe, nunca mediu esforços em me ajudar, contribuindo e muito para o desenvolvimento de toda à pesquisa. Obrigado professor, pelo apoio, dedicação, profissionalismo e amizade durante todo o mestrado.

Aos meus novos amigos e companheiros de bancada no Laboratório de Química de Produtos Naturais: Wendel Cruvinel, Aline Laiane, Larissa Sousa, Fernando Duarte, Fernando Campos, Rodrigo Cruvinel, Jessika Rezende e Josemar Oliveira. A cada um de vocês, sou muito grata pela amizade e companheirismo nessa jornada.

Aos meus colegas de curso, em especial a Jeisa Farias, uma amiga especial, que se tornou uma Irmã. Esteve comigo durante todos os momentos vividos, fossem eles bons ou não! Amiga você é um tesouro.

À aluna de iniciação científica, Aline Deniz que me auxiliou no desenvolvimento dos experimentos. Muito obrigada por toda sua dedicação!

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

A igreja Assembleia de Deus (Setor Genoveva) em Rio Verde- GO, onde fiz amigos e irmãos nos acolheram com muito amor, por isso, serie eternamente grata!

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, sinto-me eternamente grata por toda experiência transmitida.

A CAPES–Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

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

BIOGRAFIA DO AUTOR

Flávia Fernanda Alves da Silva Resende, filha de Maria do Socorro Alves da Silva e Luiz Carlos Alves da Silva, nasceu em 03 de agosto de 1993 na cidade de Barreiros-PE. Em junho de 2017, graduou-se em Química Bacharelado pela Universidade Federal de Goiás, campus Jataí-Goiás. Em setembro de 2018, iniciou no curso de pós-graduação *stricto sensu* em Agroquímica, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campos Rio Verde- GO. Atuando na linha de pesquisa em Química dos Produtos Naturais.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Família Rutaceae.....	3
1.2 Gênero <i>Murraya</i>	4
1.3 <i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack.....	4
1.4 Metabolismo Especial e Óleos Essenciais.....	6
1.5 Aplicações dos Óleos Essenciais.....	7
1.5.1 Atividade anticariogênica e antimicobacteriana.....	8
1.5.2 Atividade antifúngica contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) De Bary.....	10
1.5.3 Atividade antioxidante.....	11
1.5.4 Atividade leishmanicida.....	12
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos.....	19
3. CAPÍTULO I.....	20
3.1 INTRODUÇÃO.....	21
3.2 EXPERIMENTAL.....	23
3.2.1. Material Vegetal.....	23
3.2.2. Extração dos óleos essenciais.....	23
3.2.3. Identificação da composição química dos óleos essenciais.....	24
3.2.4. Atividade Anticariogênica.....	24

3.2.5. Atividade Antimicobacteriana.....	25
3.3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	26
3.4. CONCLUSÃO.....	31
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
4. CAPÍTULO II.....	37
4.1. INTRODUÇÃO.....	38
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.2.1 Material Vegetal.....	39
4.2.2 Extração do Óleo Essencial.....	39
4.2.3 Identificação da composição química do óleo essencial.....	39
4.2.4 Atividade Antifúngica <i>in vitro</i> do óleo essencial das folhas de <i>M. paniculata</i> contra o fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	40
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.4 CONCLUSÃO.....	45
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
5. CAPÍTULO III.....	49
5.1. INTRODUÇÃO.....	50
5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.2.1. Atividade antioxidante dos óleos essenciais de folhas e frutos (Maduros e Verdes) de <i>M. paniculata</i>	54
5.2.2. Atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas e frutos (Maduros e Verdes) de <i>M. Paniculata</i>	56
5.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
5.3.1 Material Vegetal.....	57
5.3.2 Extração dos Óleos Essenciais.....	57
5.3.3 Análise dos Óleos Essenciais.....	57
5.3.4 Atividade Antioxidante.....	58
5.3.5 Atividade leishmanicida.....	58
5.4 CONCLUSÃO.....	59
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
CAPÍTULO I	
Composição química dos óleos essenciais dos frutos maduros (OE-FM) e frutos verdes (OE-FV) de <i>Murraya paniculata</i> (Rutaceae).....	27
Atividade Anticariogênica <i>in vitro</i> dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de <i>M. paniculata</i> contra bactérias orais em estudo.....	29
Atividade Antimicobacteriana <i>in vitro</i> de óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de <i>M. paniculata</i> (CIMS = µg/mL) contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> e <i>Mycobacterium. Avium</i>	30
CAPÍTULO II	
Composição química do óleo essencial (OE-FM) de folhas de <i>M. paniculata</i> coletadas em Rio Verde, Goiás, Brasil.....	41
CAPÍTULO III	
Composição química dos óleos essenciais dos frutos maduros (OE-FM), frutos verdes (OE-FV) e folhas (OE-FM) de <i>M. paniculata</i>	63
Atividade leishmanicida dos óleos essenciais dos frutos maduros (OE-FM), frutos verdes (OE-FV) e folhas (OE-FM) de <i>M. paniculata</i> contra formas promastigotas de <i>Leishmania. amazonensis</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
INTRODUÇÃO	
Folhas e frutos verdes e maduros de <i>M. paniculata</i>	5
Biossíntese simplificada dos terpenos.....	7
Sintomas típicos provocados pelo fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	11
CAPÍTULO I	
Folhas e frutos verdes e maduros de <i>M. paniculata</i>	23
Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de <i>M.paniculata</i>	28
CAPÍTULO II	
Estruturas químicas dos principais constituintes identificados no óleo essencial de folhas de <i>M. paniculata</i>	42
CAPÍTULO III	
<i>M. paniculata</i> (L.) Jack(Rutaceae): Folhas e Frutos.....	62
Estruturas dos principais constituintes presentes nos óleos essenciais das folhas e frutos (verdes e maduros) de <i>M. paniculata</i>	62

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

ATCC 10556	<i>Streptococcus sanguinis</i>
ATCC 12478	<i>Mycobacterium kansasii</i>
ATCC 25175	<i>Streptococcus mutans</i>
ATCC 25291	<i>Mycobacterium avium</i>
ATCC 25975	<i>Streptococcus salivarius</i>
ATCC 27294	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
ATCC 33478	<i>Streptococcus sobrinus</i>
ATCC 49456	<i>Streptococcus mitis</i>
BDA	Ágar batata dextrose
CMI	Concentração mínima inibitória
IC₅₀	Concentração inibitória de 50%
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
IR	Índice de retenção
<i>M. paniculata</i>	<i>Murraya paniculata</i> (L) Jack
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
OE-FM	Óleo essencial dos frutos maduros de <i>Murraya paniculata</i>
OE-FV	Óleo essencial dos frutos verdes de <i>Murraya paniculata</i>
OE-FM	Óleo essencial das folhas de <i>Murraya paniculata</i>
PIC	Percentual de Inibição do Crescimento Micelial

RESUMO

SILVA, FLÁVIA FERNANDA ALVES. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2019. **Composição Química e Atividades Biológicas dos óleos essenciais das folhas, frutos verdes e maduros de *Murraya paniculata* (L) Jack.** Orientadora: Dr.^a Cassia Cristina Fernandes Alves. Coorientador Dr. Mayker L. Dantas Miranda.

A espécie *Murraya Paniculata* (L) Jack é conhecida popularmente como murta de cheiro e possui grande potencial terapêutico descrito na literatura. Suas principais atividades biológicas são conferidas a presença de terpenos em sua composição química. Com isto, objetivou-se nesse estudo, determinar a composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais extraídos das folhas, frutos verdes e maduros de *M. paniculata*. Os OEs foram obtidos, através da técnica convencional de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. E, a identificação dos compostos presentes nos OEs foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A atividade anticariogênica dos OEs dos frutos (Verdes e Maduros) foi avaliada contra patógenos orais: *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *S. salivarius*. Como resultados, os OEs exibiram moderada atividade com valores de CIM entre 100 e 400 µg/mL. Em relação à atividade antimicobacteriana, os OEs se mostraram ativos diante de *Mycobacterium kansasii* (CIM = 250 µg/mL), moderadamente ativos diante de *M. tuberculosis* (CIM = 500 µg/mL) e inativos contra *M. avium* (CIM = 2000 µg/mL). Já a atividade antifúngica do OE das folhas, foi investigado pela metodologia de difusão em disco, contra os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). Foram utilizadas diferentes concentrações do OE diluído em DMSO. De modo que, observou-se que na dose de 300 µL do OE exibiu 91,2% de inibição do crescimento micelial do fungo. Para a atividade antioxidante, utilizou-se o método da capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH). O ensaio exibiu valores de IC₅₀ = 932.55 µg/mL 1123.72 µg/mL e 716.72 µg/mL para os OEs das folhas e frutos (Maduros e Verdes), respectivamente. Por fim, para avaliar a atividade leishmanicida, utilizou-se as formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*. Como resultado, observou-se que, os OEs das folhas apresentaram alta atividade leishmanicida, com IC₅₀ = 7.33±2.07 µg/mL. Enquanto, os OEs dos frutos (Maduros e Verdes) apresentaram valores de IC₅₀ = 13.04±1.64 e 30.77±2.07 µg/mL, respectivamente. Este trabalho descreve pela primeira vez a composição química, bem como as atividades biológicas de diferentes partes do óleo essencial de *Murraya Paniculata* (L) Jack coletadas no Brasil.

PALAVRAS-CHAVES: Produtos naturais; murta de cheiro; óleo essencial; composição química; atividades biológicas.

ABSTRACT

The *Murraya Paniculata* (L) Jack species is popularly known as myrtle scent and has a great therapeutic potential described in the literature. Its main biological activities are conferred by its terpenes presence in their chemical composition. The objective of this study was to determine the chemical composition and biological activities of the essential oils extracted from the leaves, green and ripe fruits of *M. paniculata*. The SOs was obtained by the conventional hydrodistillation technique in Clevenger type apparatus. And the identification of the compounds present in the OEs was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The anticariogenic activity of fruit (Green and Ripe) OEs was evaluated against oral pathogens: *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* and *S. salivarius*. As a result, the SOEs exhibited moderate activity with MIC values between 100 and 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Regarding antimicobacterial activity, SOEs were active against *Mycobacterium kansasii* (MIC = 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$), moderately active against *M. tuberculosis* (MIC = 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and inactive against *M. avium* (MIC = 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The leaf EO antifungal activity was investigated by the disk diffusion methodology against the fungi *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). Different concentrations of diluted EO in DMSO were used. Thus, it was observed that at the 300 μL dose of EO showed 91.2% inhibition of fungal mycelial growth. For antioxidant activity, the method of sequestering capacity of the 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazine (DPPH) radical was used. The assay showed IC₅₀ values = 932.55 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 1123.72 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 716.72 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for leaf and fruit OEs (Ripe and Green), respectively. Finally, to evaluate the leishmanicidal activity, the promastigote forms of *Leishmania amazonenses* were used. As a result, it was observed that the leaf OEs showed high leishmanicidal activity, with IC₅₀ = $7.33 \pm 2.07 \mu\text{g} / \text{mL}$. Meanwhile, the fruit OEs (Ripe and Green) presented IC₅₀ values = 13.04 ± 1.64 and $30.77 \pm 2.07 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. This paper describes for the first time the chemical composition as well as the biological activities of different parts of *Murraya Paniculata* (L) Jack essential oil collected in Brazil.

KEY WORDS: Natural products; smell myrtle; essential oils; chemical composition; biological activities.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Rutaceae

A família Rutaceae apresenta cerca de 160 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália (EPIFANO et al., 2015). No Brasil, a família Rutaceae está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica, apresentando centro de diversidade em regiões do cerrado brasileiro (CAMPELO et al., 2013).

A diversidade de seus metabólitos secundários, assim como seu potencial biotecnológico e farmacêutico, vem despertando interesse em estudos da família Rutaceae entre os pesquisadores do mundo. Dentre suas características, uma delas inclui a produção de óleos essenciais. No Brasil, o gênero *Citrus* um dos principais da família Rutaceae, vem destacando-se economicamente. Seus óleos essenciais são usados como subprodutos em indústrias de suco, levando o Brasil a ficar em posição de destaque como o país com a maior produção de óleos essenciais de *Citrus* do mundo (ESTEVAM et al., 2017).

De modo geral, a família Rutaceae pertence a um dos maiores grupos de metabólitos secundários proveniente de plantas, com alto potencial em atividades biológicas. Estudos de extratos e OEs com plantas pertencentes a essa família, constantemente têm sido desenvolvidos, visto a grande variedade de espécies (NEBO et al., 2014).

Neste contexto, dentre os metabólitos secundários presente na família, destacam-se, os alcaloides biologicamente derivados do ácido antranílico, inúmeras cumarinas, incluindo muitas cumarinas substituídas por isopreno, e nortriterpenos do tipo limonoide. Estes compostos apresentam elevado potencial biológico, como por exemplo, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, inseticida, antifúngica e entre outros (SHIVAKUMAR et al., 2017; APPELHANS et al., 2018; ALLEVATO et al., 2019).

Dentre os gêneros que constitui a família Rutaceae, o gênero *Murraya*, é conhecido pela grande variedade de espécies e também por possuir moléculas

biologicamente ativas. Este tem chamado a atenção de pesquisadores de todo o mundo, isso porque, possui grande biodiversidade. Várias de suas espécies foram introduzidas no Brasil, e são usadas para arborização, bem como, pela população na medicina popular (SILVA et al., 2018).

1.2 Gênero *Murraya*

O gênero *Murraya*, destaca-se por seu grande potencial econômico, refletido por seu uso alimentar e farmacológico. Compreende cerca de 35 espécies de plantas com flores, são nativas do Sudeste Asiático, embora tenha ampla distribuição pelo mundo (CAMPAELO, et al., 2013).

O gênero consiste principalmente de pequenos arbustos e ervas que foi introduzido no Brasil para arborização. Como exemplos de espécies pertencentes a este gênero, podendo citar: *M. euchrestifolia*, *M. koenigii* (L.) Spreng, *M. paniculata* (L.) Jack, *M. sumatrana*, *M. amoena*, *M. omphalocarpa* Hayata, *M. alata* Drake, *M. Caloxylon* Ridl, *M. crenulata* (Turcz.) Oliv, *M. brevifolia*, *M. burmanni*, *M. alternans* e *M. siamensis* (MARTINS et al., 2011; RAHAMAN et al., 2010).

Neste contexto, *M. paniculata* (L.) Jack é a espécie deste gênero mais difundida no Brasil, por possuir valor ornamental. A espécie tem características marcantes, proveniente de sua folhagem verde intenso, além de, um amplo aglomerado de flores perfumadas, muito utilizadas em jardins. (MARQUICA et al., 2008)

Na medicina popular as folhas de *M. paniculata* (L.) Jack são muito utilizadas para diferentes fins. Várias de suas ações farmacológicas já foram exibidas por seus extratos vegetais e descritas nas literaturas, como por exemplo, é considerada adstringente e estimulante para o tratamento de reumatismo, tosse, diarreia, distúrbios mentais, dor de dente e entre outros (SHIVAKUMAR et al., 2017; OLAWARE et al., 2016; SAQBI et al., 2015; SOUZA et al., 2008).

1.3 *Murraya paniculata* (L.) Jack

A espécie *M. paniculata* (L.) Jack (Rutaceae) (figura 1) é uma árvore nativa da Índia, introduzida no Brasil para arborização utilizada como ornamentação de jardins, por causa de sua resistência ao clima e tolerância ao solo. Conhecida popularmente no Brasil como murta de cheiro ou dama da noite, em várias regiões do mundo tem sido considerada medicinal (DOSOKY et al., 2016).



Figura 1. Folhas e frutos verdes de *M. Paniculata* (L.) Jack (A). Folhas e frutos maduros de *M. paniculata* (L.) Jack (B).

Estudos a fim de investigar, desvendar e comprovar os mecanismos de ação da espécie *M. paniculata*, afirmam que, diversas partes da espécie possuem ações farmacológicas. Estudada em diferentes partes mundo está espécie possui resultados promissores, quanto ao seu potencial biológico. Por exemplo, sua decocção tem sido administrada para tratar úlcera bucal e o furúnculo dorsal na Índia. A pasta de folha quente é aplicada para promover a cicatrização de ossos quebrados no sul da China. E na província de Fujian, na China, as folhas são usadas para aliviar dores reumáticas em adultos e enfisema em crianças (ZOU et al., 2014).

Diante de sua importância medicinal, estudos identificam que a atividade biológica conferida aos extratos da espécie pode estar relacionada à presença de compostos majoritários como: os alcaloides indólicos, flavonoides e cumarinas. Estes são componentes ativos, podendo possuir ação isolada ou em sinergismo para as mais variadas atividades biológicas, entre elas, antimicobacteriana, anticariogênica, antioxidantes e antifúngicas (WANG et al 2019; SAYAR et al., 2014; RAHMAN et al., 2010; MESQUITA et al., 2008).

Entretanto, em relação aos estudos da composição química e atividades biológicas dos OEs extraídos de *M. paniculata*, poucos trabalhos são encontrados na literatura. Destaca-se entre os trabalhos já reportados, estudos de óleos essenciais obtidos de espécimes ocorrentes em outros países como Nigéria, Bangladesh, Nepal e Cuba (KISUMA et al., 2017; NETA et al., 2017; FASAL et al., 2017; OSOKY et al., 2016; ZHU et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2012; SHARKER et al., 2009; CHOWDHURY et al., 2008; SOUZA et al., 2008)

Assim, o estudo em questão, exibiu resultados preliminares e inéditos a respeito da composição química de *M. paniculata* (L.) Jack, bem como, evidenciou suas atividades biológicas.

1.4 Metabolismo Especial e Óleos Essenciais

As plantas, através de reações químicas são capazes de produzir, transformar e acumular substâncias. Estas são capazes de garantir a sobrevivência, adaptação e perpetuação das espécies nos mais variados ecossistemas. Os OEs são um conjunto de reações químicas, que exercem funções importantes nas plantas contra patógenos e herbívoros, além de, colaborem para a atração dos polinizadores e disseminadores de sementes. Esses são provenientes dos metabolitos secundários (MAHDIEH et al., 2018; DUDAREVA et al., 2013; MAFFEI et al., 2011).

Os OEs podem ser classificados como uma mistura complexa que contém hidrocarbonetos saturados e insaturados (álcool, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, óxidos, fenóis), além de, apresentarem alta volatilidade. Estes podem ser obtidos por diferentes partes da planta (caule, flor, raízes, folhas e frutos), através de diferentes técnicas, como por exemplo, a destilação por arraste a vapor d'água. Assim, a eficiência dos óleos essenciais, depende da composição e orientação de seus grupos funcionais (MAHDIEH et al., 2018; DONSI e FERRARI., 2016; MAIA et al., 2015; SANTANA et al, 2013)

Dentre as principais classes de substâncias que constituem os OEs, destacam-se os terpenos e os fenilpropanoides, esses são classificados como o maior grupo de compostos em produtos naturais, com mais de 15.000 compostos, que são sintetizados a partir da rota do ácido mevalônico (Figura 2) (XAVIER et al., 2015; JAWDAT et al., 2016) .

A síntese dos terpenos pode produzir muitos produtos a partir de um único substrato. Isto porque, são formados por unidades básicas de isopreno. Esses são classificados de acordo com número de unidades isoprênicas em, monoterpenos com 10 carbonos, sesquiterpenos com 15 carbonos e diterpenos com 20 carbonos (MAHDIEH et al., 2018; DUDAREVA et al., 2013; DEGENHARDT et al., 2009).

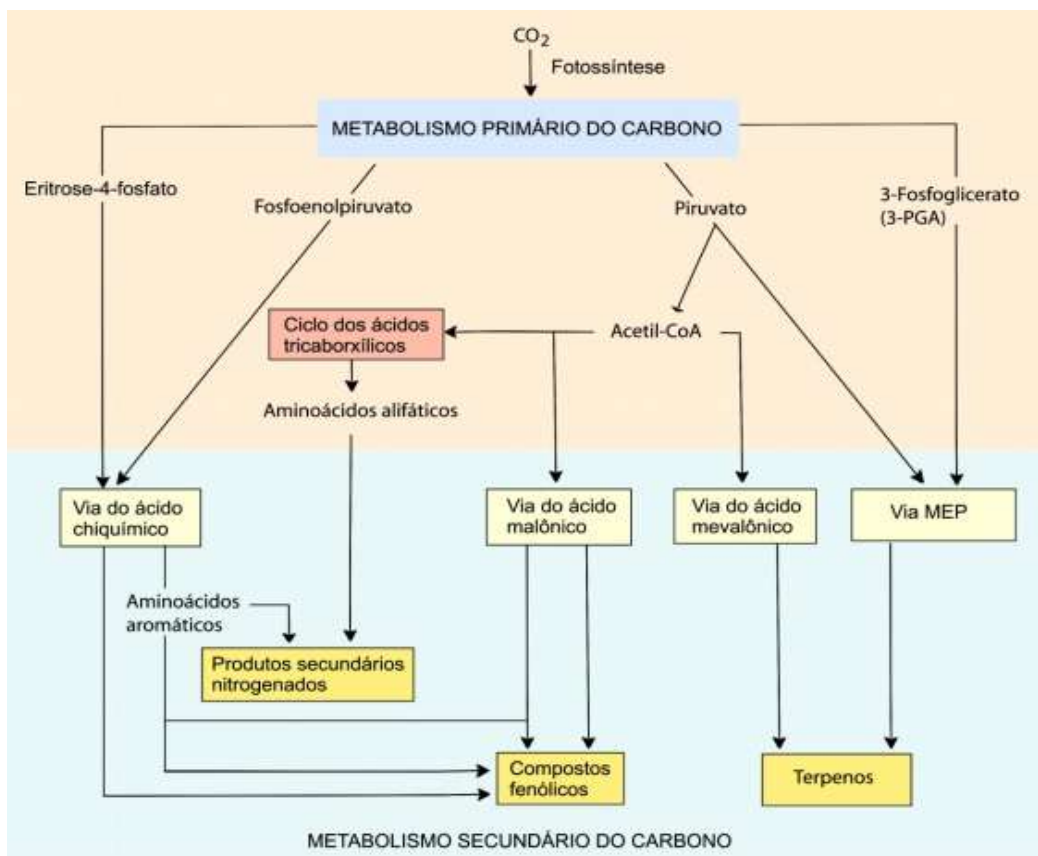


Figura 2 – Biossíntese simplificada de terpenos. Fonte: ZEIGER (2006)

Entretanto, vale ressaltar que, os OEs podem sofrer variações em sua composição química. Isso ocorre, através dos diferentes estímulos ambientais recebidos pelas plantas, tais como: temperatura, técnica de extração, radiação ultravioleta, nutrientes, ataque de patógenos, desenvolvimento da planta e a sazonalidade. Por isso, se faz necessário um estudo preliminar, a respeito do ambiente em que a planta está localizada. De modo que, a coleta do material em estudo, deve ser exclusiva de um mesmo ambiente, para que, com isso, se tenha a melhor obtenção de substâncias específicas e maior quantidade de óleo essencial (MATIAS et al., 2016).

1.5 Aplicações dos Óleos Essenciais

Nos últimos anos, várias pesquisas com produtos naturais, tendo à utilização dos OEs como matérias-primas foram desenvolvidas. Segundo dados da organização mundial de saúde (OMS, 2010), 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas, sendo considerados em alguns países, como fonte de único recurso terapêutico (SCHENKEL, 2000).

Os OEs possuem várias aplicações nas indústrias, como por exemplo, farmacêuticas, cosméticas, agricultura no combate contra pragas e doenças agrícolas, entre outras (PINTO et al., 2002; BUTLER, 2008). Neste sentido, pesquisas com OEs têm como finalidade, evidenciar as espécies nativas de cada região, que fazem parte da medicina popular, a fim de investigar e desvendar seus mecanismos de ação que confere a cada espécie de planta uma específica atividade biológica e com isto desenvolver fontes alternativas para novas moléculas bioativas à base de produtos naturais (ESTEVAM et al., 2017).

Diante do exposto, a fim de evidenciar a espécie brasileira *M. paniculata* (L.) Jack, espécie produtora de OEs, localizada em regiões do cerrado brasileiro, o estudo em questão abordou, pela primeira vez na literatura, a composição química de diferente parte da espécie, bem como, algumas de suas principais atividades biológicas, como, por exemplo, as atividades biológicas: anticariogênica, antimicobacteriana, antifúngicas, antioxidante e leishmanicida.

1.5.1 Atividade biológica Anticariogênica e Antimicobacteriana

A cárie dentária é uma doença provocada principalmente por bactérias do gênero *Streptococcus*. Assim, a cárie é considerada fonte de infecção decorrente de acúmulo de bactérias na superfície dentária. O biofilme é a primeira etapa para a formação das lesões de cáries, sua formação depende da interação dos microrganismos com o dente e dos microrganismos entre si. Diante disto, as bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus salivarius*, são as principais responsáveis pela cárie dental, considerada um problema de saúde pública, podendo levar a outras doenças como a bacteremia, endocardite e meningite (SILVA et al., 2018; DI VITO et al., 2019; DELORME et al., 2015).

Segundo Harkat-madouri et al. (2015), as atividades biológicas contra bactérias periodontopatogênicas, são conferidas a presença de monoterpenos oxigenados presente na composição química das plantas. Ele avaliou o OE das folhas de *Eucalyptus globulus*. E concluiu que, a utilização de produtos naturais pode ser eficaz e uma fonte alternativa, aos tratamentos convencionais.

Ainda em relação à saúde bucal Filogonio et al. (2011), observou que, os OEs, que possuem em sua composição química composto como timol, eucaliptol, metil salicilato e mentol, estes são propícios a demonstrarem alta capacidade de reduzir o

biofilme pré-formado e retardar o desenvolvimento do biofilme existente. Assim, enxaguatórios bucais contendo 0,7 % dos OEs em sua formulação, quando aplicados diariamente, reduziram efetivamente a inflamação gengival podendo afetar moderadamente a microbiota subgengival, reduzindo as proporções de patógenos periodontais.

Como visto, os produtos naturais têm se destacado como alternativas para o tratamento e prevenção da cárie dental e doenças periodontal. Neste sentido, os OEs estão associados a efeitos anti-inflamatórios, no entanto, ainda é recente o seu uso no tratamento da saúde bucal. Por isso, mais estudos nesse sentido se fazem necessários (SILVA et al., 2018).

Em relação à atividade antimicrobacteriana, pesquisas que visam a utilização de OEs, como possível alternativa aos tratamentos convencionais, cujas bactérias têm se tornado cada dia mais resistente, vêm sendo continuamente desenvolvidas. As doenças causadas por microbactérias são consideradas como negligenciadas, causando mortes anuais significativas em países subdesenvolvidos (MIRANDA et al 2010).

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Mycobacterium*. É uma doença endêmica que abrange vários países subdesenvolvidos. O Brasil ocupa a 14º posição entre os 22 países que são responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. *Mycobacterium tuberculosis* é a espécie responsável pelo maior número de casos de morbidade e mortalidade entre a população (FERNANDES et al 2017).

Alguns pesquisadores conferem a presença de compostos químicos como o β -cariofileno, germacreno D, α -humuleno, α -copaeno presente nos OEs, a ação antimicrobianas, os compostos já são bem descritas na literatura, e podem agir em sinergismo ou isoladamente (DIAS et al, 2017; MATINS et al 2015; MOREIRA et al 2014).

Em concordância, Silva et al (2013) em seus estudos, obtiveram resultados promissores ao estudar a ação do OE dos frutos de *Pterodon emarginatus* diante das bactérias do gênero *Mycobacterium*, foram encontrados em sua composição química, compostos como: α -cubebeno, α -copaeno, α -ilangeno, α -gurjuneno, β -cariofileno, γ -humuleno, entre outros, responsáveis pela ação biológica.

Assim, fontes alternativas que visam melhor condição de vida para a população de países subdesenvolvidos se fazem necessárias. As utilizações de produtos naturais

nesse sentido vêm se mostrando promissora. Porém, ainda são necessários estudos a fim de identificar e isolar as moléculas responsáveis pela ação biológica nos OEs.

1.5.2 Atividade biológica antifúngicas contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary.

Atualmente pesquisadores de todo mundo vêm despertando interesse, nos impactos ambientais, provocados pelo uso excessivo de agrotóxicos que têm prejudicado, principalmente, a saúde da população. No entanto, fontes alternativas, a fim de controlar fungos fitopatogênicos por contato direto com óleos essenciais *in vitro* e *in vivo*, têm sido pouco investigadas (REIS et al., 2011).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é o causador da doença conhecida como mofo branco, pertence à família Sclerotiniaceae na ordem Helotiales no filo Ascomycota (Bolton et al. 2006). É um agente fitopatogênico do solo que infecta mais de 600 espécies de plantas em todo mundo, incluindo culturas de importância comercial como a soja, o feijão entre outras (Boland & Hall, 1994; Bolton et al., 2006; ETHUR et al., 2004).

O processo de contaminação do fungo *S. sclerotiorum* ao solo se dá, através de disseminação a partir das sementes ao solo a temperaturas de (20-25°C). Esse fungo espalha-se rapidamente através de esporos, frequentemente em forma de escleródios, de modo, a contaminar os caules, as flores e as folhas (Figura 3). Os escleródios podem residir no solo por vários anos, desde que se tenham condições favoráveis, tais como, temperatura, umidade do solo, e profundidade em que o escleródio se encontra no solo, fazendo com que a população da doença aumente a cada plantio. (SABATÉ et al., 2018).

Por isso, estudos que visam combater esse fungo, tendo como base produtos naturais, em especial a utilização de OEs, faz-se necessário, a fim de evitar perdas anuais significativas entre nas culturas. Valadares et al (2018), em seus estudos, observaram a inibição do OEs extraído das folhas e inflorescências de *Piper aduncum*, diante do fungo fitopatogênico *sclerotiorum*. As atividades antifúngicas *in vitro* dos OEs diante dos fungos demonstraram que acima de 30 µL de OEs houve inibição dos escleródios de 100% para a inflorescência, enquanto as folhas com 50 µL do OEs inibiram 98,74%. Podendo assim, mostrar a eficiência dos OEs no combate a doenças fitopatogênicas.

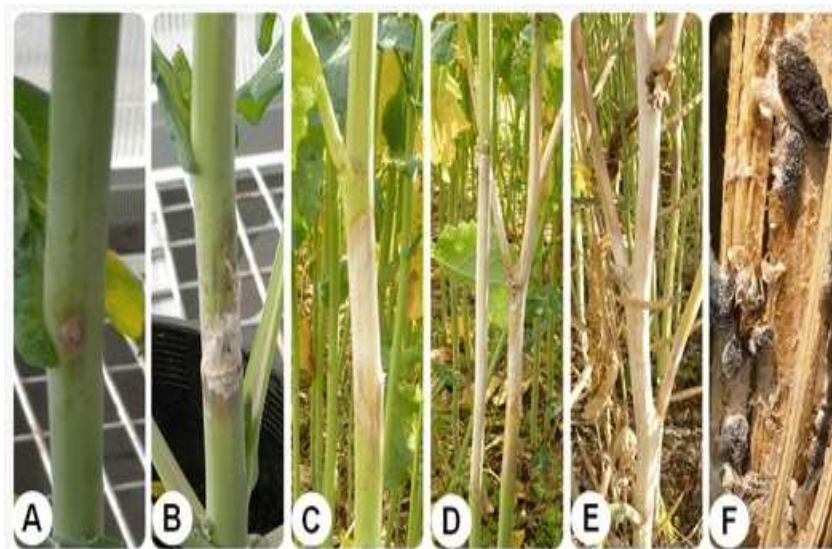


Figura 3 – Sintomas típicos provocados pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. (A) Desenvolvimento inicial da lesão na haste; (B) (D) Expansão gradual da lesão e cobre toda a planta; (E) Causou a morte da planta; (F) Escleródio desenvolvido dentro da haste morta. Fonte: **KAMAL et al.**, 2016.

Vários pesquisadores justificam a promissora atividade dos OEs diante do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, a sua ação sinérgica entre os compostos, que podem ser conferida a presença de compostos como β -cariofileno, α -zingibereno e β -cubebeno, no óleo essencial (VALADARES et al., 2018; PEREIRA et al., 2017; XAVIER et al., 2016).

1.5.3 Atividades antioxidantes

Os OEs têm sido ainda amplamente estudados quanto ao seu potencial de inibição de radicais livres. Isso porque, substâncias antioxidantes são aquelas que inibem ou diminuem os efeitos desencadeados pelos radicais livres, uma vez que os radicais estão envolvidos em várias doenças correlacionados com o estresse oxidativo, como, por exemplo, câncer, enfisema, arteriosclerose e artrite. (CHIRAGJ et al., 2013).

No teste utilizando o radical DPPH, o EC_{50} (Concentração inibitória de 50%) reflete o nível de descoloração por meio da capacidade de doação de hidrogênio de um composto. Quando a forma de radicais DPPH é eliminada por um antioxidante para formar uma molécula de DPPH estável. Isto leva a mudança de cor de púrpura para amarelo e a diminuição na absorbância, demonstrando sua atividade antioxidante (MIRANDA 2016).

Carneiro et al (2016) , em sua pesquisa, evidenciando a espécie *Eugenia klotzschiana*, obtiveram resultados promissores. As atividades antioxidantes dos OEs foram avaliadas pelos métodos DPPH e ABTS. E Concluiu-se que, esta atividade pode estar correlacionada a presença de compostos majoritários como o β -elemeno e D-germacreno na espécie.

Neste sentido, a fim de se identificar novas moléculas com substâncias antioxidantes, pesquisadores intensificam pesquisas para desvendar e isolar os mecanismos de ação dos compostos presentes nos OEs.

1.5.4 Atividade Leishmancida

A leishmaniose é uma doença tropical causada por um parasita intracelular, um protozoário do gênero *Leishmania*, cujo vetor é flebotomíneo, um pequeno inseto pertencente à ordem Díptera. No Brasil, esse mosquito é chamado de mosquito palha. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a leishmaniose seja a segunda doença transmitida por insetos que mata grande quantidade de pessoas em todo mundo (Blanco et al., 2017).

No Brasil, a doença é causada pelas seguintes espécies: *Leishmania brasiliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*. A *L. amazonensis* possui um alto potencial patogênico, tendo sido relatado que está espécie em questão já teve registros de lesões cutâneas, difusas e viscerais (SILVA et al., 2016).

Alguns compostos sintéticos já são fontes utilizadas no tratamento da leishmaniose, como, por exemplo, antimoniais, anfotericina B e miltefosina. No entanto, esses medicamentos têm efeitos secundários tóxicos para o corpo humano. Diante da falta de vacinas eficazes, o surgimento de resistência aos fármacos existentes e a ausência de tratamentos menos tóxicos e acessíveis e se faz necessário uma alternativa eficaz a partir de produtos naturais (ANTINARELLI et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2017)

Alguns OEs têm se apresentados efetivos também contra leishmaniose. Segundo Kauffmann et al. (2017), a atividade leishmanicida observada em produtos naturais, em especial, nos OEs, podem ser atribuída à mistura de constituintes sesquiterpênicos que podem agir isoladamente ou em sinergismo.

Portanto, os estudos químicos de plantas, a extração de OEs constituem-se numa estratégia economicamente importante para o futuro das indústrias de perfumarias, medicamentos, defensivos agrícolas, entre outros (MIRANDA et al., 2010). Diante

disso, estudos preliminares a fim de se obter o reconhecimento e o isolamento de composto presente nas plantas medicinais, principalmente quando a planta é de conhecimento popular produtora de OEs, é de grande importância para pesquisas e desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEVATO, D.M.; GROppo, M.; RIYOTA, E.; MAZZAFERA, P. NIXON, K.C: Evolution of phytochemical diversity in *Pilocarpus* (Rutaceae), **ELSEVIER Phytochemistry**, Volume 163 , julho de 2019 , páginas 132-146

ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F. ; FERRI, P. H.; COUTO, R. O.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, janeiro de 2013, pagina 23, 224.

APPELHANS, M.S.; REICHEL, N.; GROppo, M.; PAETZOLD, C.; WEN, J. Phylogeny and biogeography of the pantropical genus *Zanthoxylum* and its closest relatives in the proto-Rutaceae group (Rutaceae), **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Volume 126 , setembro de 2018 , páginas 31-44

BLANCO, V.R; NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Rev. Virtual Quim.** (2017), 9(3), 861-876.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: Natural product – derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, p.475-516, 2008.

CAMPELO, L. M. L. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai** s , p, 15, 708, 2013.

CHIRAG, J.P.; TYAGI S.; HALLIGUDI, N.; YADAV J.; PATHAK, S.; SINGH ,S.P.; PANDEY ,A.; KAMBOJ ,D.S. SHANKAR, P. Antioxidant activity of herbal plants: a recent review. *J. Drug Discov. Therap.* 1(8), 01-08, 2013

CHOWDHURY, J. U.; BHUIYAN, M. N. I.; YUSUF, M. Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack. **A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society** ,2008, 3, 59.

CORDEIRO, M. W. S.; CAVALLIERI, A. L. F.; FERRI, P. H.; NAVES, M. M. V. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa

de *Caryocar brasiliense* nativo do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 4, p. 1127-1139, 2016.

DELORME, C.; ABRAHAM, A. L.; RENAULT, P.; GUÉDON, E. Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 381-392, 2015.

DI VITO, M.; BELLARDI, M. G.; MONDELLO, F.; MODESTO, M.; MICHELOZZI, M.; BUGLI, F.; SANGUINETTI, M.; SCLOCCHI, C.; SEBASTIANI, M. L.; BIFFI, S.; BARBANTI, L.; MATTARELLI, P. *Monarda citriodora* hydrolate vs essential oil comparison in several anti-microbial applications. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 206-212, 2019.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

DOSOKY, N. S.; SATYAL, P.; GAUTAM, T. P.; SETZER, W. N. Composition and biological activities of *Murraya paniculata* (L.) Jack essential oil from Nepal. **Medicines 2016**, paginas 3,1.

DUDAVERA, N.; KLEMPIEN, A.; MAHKEMANN, J.K.; KAPLAN, E.U. Biosynthesis, Function and Metabolic Engineering of Volatile Organic Compounds from New Phytol Plant. 198 (2013) , pp. 16 – 32.

EPIFANO F.A. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, volume 24, maio de 2015, numero 4, paginas 413-418.

ESTEVA, E. B. B.; MIRANDA, M. L. D.; ALVES, J. M.; EGEA, M. B.; PEREIRA, P. S.; MARTINS, C. H. G.; ESPERANDIM, V. R.; MAGALHÃES, L. G.; BOLELA, A. C.; CAZAL, C. M.; SOUZA, A. F.; ALVES, C. C. F. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). **Revista Virtual de Química**, julho de 2017, numero 8, paginas 1842.

FAISAL, M.; SARKER, M. M.; RAHMAN A.; HOSSAIN, A. I.; RAHMAN, S.; BASHAR, A. B. M. A.; JAHAN, R. Rahmatullah, M. *Murraya paniculata* (L.) Jack: a potential plant for treatment of toothache. **Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy** agosto de 2016, paginas 2, 1.

HARKAT-MADOURI, L.; ASMA, B.; MADANI, K.; SAID, Z. B. O. S.; RIGOU, P.; GRENIER, D.; ALLALOU, H.; REMINI, H.; ADJAOU, A.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 148-153, 2015.

KAUFFMANN C, ETHUR EM, AROSSI K, HOEHNE L, FREITAS EM, MACHADO GMC, Cavalheiro MMC, Flach A, Costa LAMA, Gnoatto SCB (2017) Chemical composition and evaluation preliminar of antileishmanial activity *in vitro* of essential oil from leaves of *Eugenia pitanga*, a native species of Southern of Brazil. J. Essent. Oil Bear. Pl. 20(2), 559-569.

MAFFEI, M.E.; GERTSCH,J.; APPENDINO, G.; Plant volatiles: production, function and pharmacology **Nat. Prod.** 28 (8) (2011) , pp. 1359 – 1380

MARTÍN, C. M. C. Acercamiento al género *Murraya* (Rutaceae) y a la especie *Murraya paniculata* (L.) Jack. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, julho de 2011,paginas, 16, 408.

MATIAS, E. F.; ALVES, E. F.; SILVA, M. K.; CARVALHO, V. R.; FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, J. V.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, J. M. F. L.; FILHO, J. R.; COSTA, J. G. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.

MESQUITA, S. G.; MARTINEZ, M. F.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; Lieber, S. R.; Lago, J. H. G. Constituintes químicos das folhas de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**2008, 18, 563.

MIRANDA A. Avaliação do potencial antiparasitario do extrato alcooldico e de alcooloides este roldais dos frutos de *Solanum yocarpum* a.St-hill. São Paulo 2010. Dissertação (**Mestrado na área ciências farmacêuticas**). Universidade de São Paulo

NEBO, L.; VARELA, M.; MOLINILLO, J.M.G.; SAMPAIO, O.M.; SEVERINO, V.G.P.;CAZAL, C.M.; FERNANDES, M.F.G.; FERNANDES, J.B.; MACIAS,F.A. *Phytotoxicity of alkaloids, coumarins and flavonoids isolated from 11 species belonging to the families Rutaceae and Meliaceae*, **Phytochemistry letters**, Volume 8 , maio de 2014 , páginas 226-232.

NETA, M. C. S.; VITTORAZZI, C.; GUIMARÃES, A. C.; MARTINS, J. D. L.; FRONZA, M.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and

fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharmaceutical Biology* Desembrode 2017, paginas 55, 190.

OLAWORE, N. O; HAM, K.; KANG, S.; PARK, Y.; N. J.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata*(L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). **Flavour and Fragrance Journa**, setembro de 2016,pagina, 20, 54.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

RAHMAN, M.A.; HASANUZZAMAN, M.; UDDIN, N.; SHAHID, I. **Atividades antidiarreicas e antiinflamatórias de *Murraya paniculata* (L.) Jack, Farmacologia** , agosto de 2010, numero 3, paginas. 768 – 77.

REIS, E. M.; CASA, R. TREZZI.; BIANCHIN, V. Control of plant disease by crop rotation.**Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.

Rodríguez, E. J.; Ramos, G. R.; Heyden, Y. V.; Alfonso, E. F. S.; García, M. J. L.; Hernández, Y. S.; Monteagudo, U.; Morales, Y.; Holgado, B.; Martínez, J. M. H. Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of central Cuba. *Natural Product Communications***2012**, 7, 1527.

SABATÉ, D. C.; BRANDAN, C. P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. **Microbiological research**, v. 211, p. 21-30, 2018.

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. 1384p. Dissertação (**Mestrado em Agronomia**) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília.

SAQIB, F.; Ahmed, M. G.; JANBAZ, K. H.; DEWANJEE, S.; JAAFAR, H. Z. E.; HAQ, M. Z. U. Validation of ethnopharmacological uses of *Murraya paniculata* in disorders of diarrhea, asthma and hypertension. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, julho de 2015, paginas 15, 319.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its

application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* **2009**, *42*, 321.

SAYAR, J.G; SAYAR, K.; PAYDAR, M.; MURPHY, B.P. Pharmacological properties and chemical constituents of *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Med. Aromatic plants*, setembro de 2014, número 3, páginas 173 – 178.

SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G.; ATHAIDE, M. L. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: Ed.da UFSC, Cap.27, p.597-622, 2000.

SHARKER, S. et al. Antinociceptive and bioactivity of leaves of *Murraya paniculata* (L.) Jack, Rutaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p, *19*, 746, 2009.

SHIVAKUMAR, V.S; AMORIM, A.C.L.; MIRANDA, A.L.P.; ALVES, R.J.V.; BARBOSA, J.P.; COSTA, G.L.; REZENDE, C.M. Analysis of whole chloroplast genomes from the genera of the Clauseneae, the curry tribe (Rutaceae, Citrus family), **Molecular Phylogenetics and Evolution**, agosto de 2017, páginas 135–140.

SILVA, E. A. J.; DA SILVA, V. P.; ALVES, C.C.F.; ALVES, J. M.; SOUCHIE, E. L.; BARBOSA, L.C.A. Composição química do óleo essencial de folhas de *Psidium guajava* e sua toxicidade contra *Sclerotinia sclerotiorum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 865-874, 2018.

SOUZA, A. D. L; KLEIN.; V.H,TECHIO.; G.N, SCHEUERMANN.; G. RECH, L. FIORENTIN. A new guaiane mannoside from a *Eutpa*-like fungus isolated from *Murraya paniculata* in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p, *19*, 1321, 2008.

VALADARES, A.C.F. ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum*: ATIVIDADE BIOLÓGICA E INCORPORAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS DE FÉCULA DE ARARUTA. Dissertação (**Mestrado em Agroquímica**) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2018.

WANG, X.; LIANG, H.; ZENG, K.; ZHAO, P. Coumarin derivatives of *Murraya paniculata* from Guangxi province, China, show variable NO inhibitory activity. **Phytochemistry**, Volume 162, junho de 2019, páginas 224-231

XAVIER, M. N. Estudo da composição química, variação sazonal e atividade biológica do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum*. Dissertação (**Mestrado em Agroquímica**) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2015.

ZHU, C.; LEI, Z.; LUO, Y. Studies on antioxidative activities of methanol extract from *Murraya paniculata*. *Food Science and Human Wellness***2015**, 4, 108.

ZOU, J.; YU,X.; QU, S.; LI, X.; JIN,Y.;SUI, D.; Protective effect of total flavonoid extracted from leaves of *Murraya paniculata* (L.) Jack on diabetic nephropathy in rats: **Food and Chemical Toxicology**, Volume 64 , fevereiro de 2014 , páginas 231-237.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química dos OEs de *M. paniculata* (L.) Jack, bem como determinar suas atividades biológicas.

2.2 Específicos

- Identificar os constituintes dos OEs extraído das folhas, frutos verdes e maduros *in natura* de *M. paniculata*;
- Avaliar as atividades anticariogênica *in vitro* dos OEs das folhas e frutos de *M. paniculata* contra *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. sanguinis*;
- Avaliar a atividade antimicobacteriana dos OEs das folhas e frutos de *M. paniculata*, contra *Mycobacterium kansasii*, *M. tuberculosis* e *M. avium*.
- Determinar a atividade antifúngica dos OEs das folhas e frutos de *M. paniculata* contra *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Determinar a atividade antioxidante dos OEs das folhas e frutos, bem como, analisar seu potencial leishmanicida.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)

Composição química e atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial de frutos (Maduros e Verdes) de *Murraya paniculata* contra gêneros bacterianos *Mycobacterium* e *Streptococcus*

Resumo: Os óleos essenciais foram obtidos pelo processo de hidrodestilação, dos frutos (Verdes e Maduros) de *Murraya paniculata* coletados em área de Cerrado, no município de Rio Verde, região sudoeste do estado de Goiás, Brasil. Os OEs foram analisados, utilizando cromatografia gasosa, com detector por ionização de chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os frutos verdes e maduros apresentaram predominância de sesquiterpenos, classe de compostos mais abundante nos óleos. Os componentes majoritários do OE extraído dos frutos maduros (OE-FM) foram: β -cariofileno (21,3%), α -Ylangeno (13,3%), germacreno-D (10,9%) e α -zingibereno (9,7%). No OE dos frutos verdes (OE-FV) os constituintes majoritários identificados foram: sesquiterpenos (25,0%), α -zingibereno (18,2%), germacreno-D (13,1%) e α -copaeno (12,7%). Ambos os OEs investigados exibiram moderada atividade anticariogênica contra as bactérias *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *S. salivarius*, com valores de CIM entre 100 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à atividade antimicobacteriana, os óleos essenciais dos frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* foram ativos frente à *Mycobacterium kansasii* (CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$), moderadamente ativos diante da *M. tuberculosis* (CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$) e inativos contra *M. avium* (CIM = 2000 $\mu\text{g/mL}$). Este trabalho revelou pela primeira vez perfil químico dos OEs extraídos dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* e descreveu também suas atividades antimicobacteriana e anticariogênica.

Palavras-chave: *Murraya paniculata*; óleos essenciais; sesquiterpenos; atividade anticariogênica; atividade antimicobacteriana; *Mycobacterium kansasii*.

3.1 Introdução

3.2 Experimental

3.2.1 Material Vegetal

3.2.2 Extração de óleos essenciais

3.2.3 Identificação da composição química dos óleos essenciais

3.2.4 Atividade Anticariogênica

3.2.5 Atividade antimicobacteriana

3.3 Resultados e discussão

3.4 Conclusão

3.1 INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma patologia localizada nos tecidos duros dos dentes, resultado do acúmulo bacteriano e de seu metabolismo nas superfícies dentárias, o que leva a formação do chamado biofilme.¹ A cárie dental é sobretudo considerada um importante problema de saúde pública, e sabe-se ainda que na cavidade oral existem mais de 700 espécies de bactérias e que algumas delas são responsáveis por esta patologia e outras doenças periodontais.²

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por micobactérias do gênero *Mycobacterium*, no entanto, a espécie responsável pelo maior número de casos de morbidade e mortalidade é o *Mycobacterium tuberculosis*.³ Em 2015, a Organização Mundial da Saúde apontou 9,6 milhões de novos casos no mundo e 1.5 milhões de mortes causadas pela doença.³ Em adição, existe aumento significativo no número de micobactérias não tuberculosas, tais como *Mycobacterium kansasii* e *M. avium*, que também afetam os pulmões, linfa, pele e articulações, provocando sequelas graves se não tratadas a tempo.⁴ Devido a estas duas doenças, a cárie e a tuberculose, acredita-se ser de suma importância a busca de novos compostos bioativos advindos de produtos naturais que exibam, sobretudo, ação efetiva contra as micobactérias e as bactérias cariogênicas.

Murraya paniculata, conhecida popularmente no Brasil como murta de cheiro, é pertencente à família Rutaceae, uma família botânica que apresenta cerca de 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, sul da África e Austrália.⁵ No Brasil, a família Rutaceae está representada por aproximadamente 29 gêneros e 182 espécies, com algumas de importância medicinal, ecológica e econômica.⁵

O gênero *Murraya* compreende cerca de 35 espécies de plantas com flores, são nativas do sudeste Asiático, embora tenha uma ampla distribuição pelo mundo.⁶ Como exemplos de espécies pertencentes a este gênero, podendo citar: *Murraya euchrestifolia*, *M. koenigii* (L.) Spreng, *M. paniculata*, *M. sumatrana*, *M. amoena*, *M. omphalocarpa* Hayata, *M. alata* Drake, *M. Caloxylon* Ridl, *M. crenulata* (Turcz.) Oliv, *M. brevifolia*, *M. burmanni*, *M. alternans* e *M. siamensis*.⁶

Especificamente, a espécie *M. paniculata* (L.) Jack é uma árvore nativa da Índia que foi introduzida no Brasil para arborização e utilização como ornamentação de jardins.⁷ Em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e também na China e Indonésia, esta espécie é considerada medicinal sendo empregada no tratamento de problemas intestinais, reumatismo e tosse.⁷

Muitas outras ações farmacológicas exibidas pelos extratos vegetais de *M. paniculata* são descritas na literatura, como por exemplo, sua aplicação no tratamento de diarreia, asma e hipertensão.⁸ Seus potenciais antifúngico⁹⁻¹⁰, analgésico,¹¹ citotóxico¹¹ e antioxidante¹² também são conhecidos, inclusive sua aplicação para dor de dente.¹³ Em relação a estudos de composição química e atividades biológicas de óleos essenciais extraídos de *M. paniculata*, poucos estudos são encontrados na literatura.¹⁴ Destaca-se entre os trabalhos já reportados, estudos de óleos essenciais obtidos de espécimes de *M. paniculata* ocorrentes em outros países como Nigéria¹⁵, Bangladesh¹⁶, Nepal¹⁷ e Cuba.¹⁸

Com destaque a *M. paniculata* ocorrente no Brasil, um estudo recente descreve a composição química do óleo essencial das folhas desta espécie coletadas no estado do Espírito Santo e suas propriedades citotóxica, fungicida e bactericida.¹⁴ Entretanto, é digno de nota mencionar que o nosso objetivo foi descrever pela primeira vez os perfis químicos e as atividades antimicobacteriana e anticariogênica *in vitro* dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* (Figura 1) coletados em área de Cerrado no interior do estado de Goiás, Brazil.

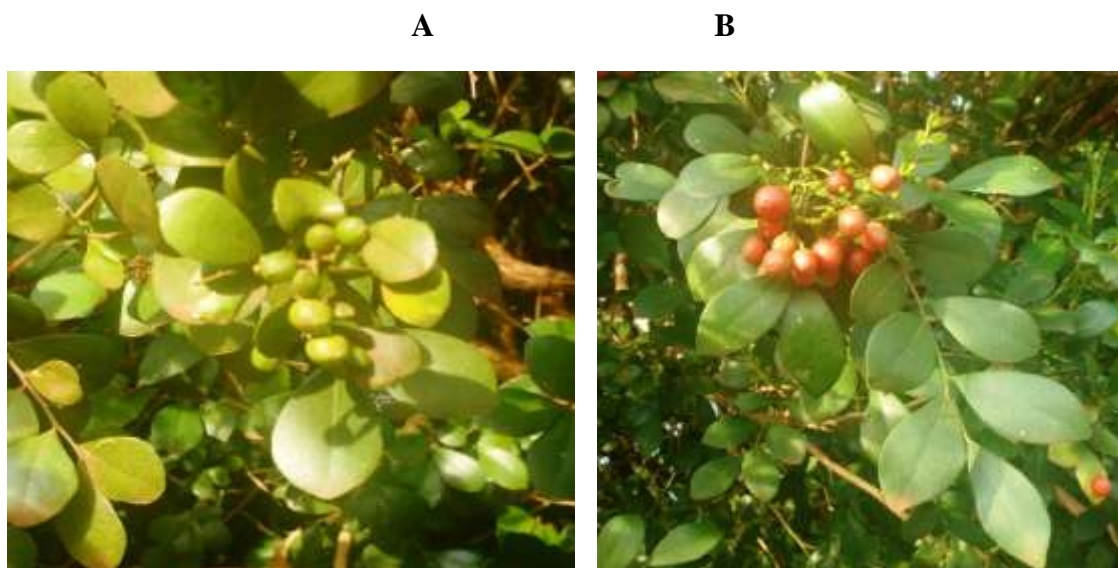


Figura 1. Folhas e frutos verdes de *M. paniculata*(A). Folhas e frutos maduros de *M. paniculata* (B).

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1. Material Vegetal

Os Frutos de *M. paniculata* verde (OE-FV) e maduros (OE-FM) foram coletados na região do Cerrado, em Rio Verde, Goiás, em outubro de 2017. A planta foi identificada pela botânica Erika Amaral e uma amostra foi depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto no número exsicata HJ 28760/MP.

3.2.2. Extração de óleos essenciais

As amostras de frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* foram submetidas ao processo de hidrodestilação por 3 horas, por aparelho tipo Clevenger. Para realizar a análise, 300 g de material vegetal foram divididos em três amostras de 100 g e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual das amostras de OEs, os vestígios de água remanescente nos óleos foram removidos com sulfato de sódio anidro, que foi seguido por filtração. O procedimento de extração foi feito em triplicata. O óleo isolado foi armazenado sob refrigeração até a análise e testes. Os rendimentos (p/p) foram calculados a partir do peso de frutos verdes e maduros e expressos como a média das análises em triplicado.

3.2.3. Identificação da composição química dos óleos essenciais

As análises para a identificação dos OEs foram feitas por cromatografia gasosa (CG) que foram realizadas por um cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010 Plus equipado com um amostrador automático AOC-20 com um detector de ionização de chama (FID) e um processador de manipulação de dados. Uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm d.i.; espessura de filme de 0,25 μm) foi empregada. As condições de operação foram as seguintes: temperatura da coluna programada para subir de 60 a 240°C a 3°C/min e depois manter a 240°C durante 5 min; gás transportador = He (99,999%), a 1,0 mL/min; modo de injeção; volume de injeção, 0,1 μL (razão de separação de 1:10); e temperaturas de injetor e detector = 240 e 280°C, respectivamente. As Concentrações relativas de componentes foram obtidas pela normalização da área do pico (%). Por fim, as áreas relativas foram a média de análises tri-compostas de CG-DIC.

As análises de CG-MS foram realizadas por um sistema Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Quioto, Jap) equipado com um amostrador automático AOC-20i. A coluna utilizada foi uma sílica fundida de um sio fundido RTX-5MS (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 de espessura de filme). O modo de ionização de elétrons ocorreu a 70 eV. O hélio (99,999%) foi empregado como gás carreador a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 0,1 μL (razão de divisão de 1:10). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram ajustadas em 240 e 280°C, respectivamente. O programa de temperatura do forno foi o mesmo utilizado para o CG. Os espectros de massa foram tirados com um intervalo de varredura de 0,5 s, na faixa de massa de 40 a 600 Da.

A identificação de componentes voláteis de frutos verdes e maduros de *M. paniculata* (Tabela 1) foi baseada em seus índices de retenção em coluna capilar RTX-5MS nas mesmas condições operacionais encontradas no CG, em relação a uma série homóloga de n-alcenos ($\text{C}_8\text{-C}_{20}$). As Estruturas foram computadorizadas com as bibliotecas de espectros Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura.¹⁹

3.2.4 Atividade Anticariogênica

A atividade anticariogênica *in vitro* dos OEs dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* foi determinada por ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) baseada no método de microdiluição em caldo.²⁰ As cepas utilizadas nos ensaios foram,

Streptococcus salivarius (ATCC 25975), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Inicialmente, as bactérias foram transferidas para ágar sangue (Difco Labs, Detroit, MI, EUA), e colônias individuais de 24 horas foram suspensas em 10,0 mL de caldo de soja tríptica (Difco). Para a análise um espectrofotômetro (Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda [λ] 625 nm] foi utilizado para padronizar as suspensões de cada microrganismo, de modo, a corresponder à transmitância de 81 λ , comprimento de onda ideal, equivalente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL).

A diluição da suspensão padronizada gerou a concentração final de 5×10^5 UFC/mL e os óleos essenciais foram dissolvidos em DMSO (Merck, Darmstadt, Germany) a 16,0 mg/mL. Foram feitas concentrações variando de 4000 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ que foram obtidas após diluição de óleos essenciais em caldo tríptico de soja (Difco). Após as diluições, as concentrações de DMSO ficaram entre 4% e 0,0039% (v/v).

Para controles negativos, utilizaram-se três poços inoculados com DMSO em concentrações variando de 4% a 1% e um poço não inoculado, livre de qualquer agente antimicrobiano. Um poço inoculado ajudou a testar se o caldo era adequado para o crescimento de microrganismos. O controle positivo foi o dicloridrato de cloro-hexidina (CHD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em concentrações variando de 5,9 a 0,115 $\mu\text{g/mL}$, diluído em meio tríptico de soja (Difco).

Por fim, microplacas de 96 poços foram seladas com parafina e incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, 30 mL de solução com solução aquosa de 0,02% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma microplaca foram utilizadas para indicar a viabilidade do microrganismo. O crescimento (valor de CIM) foi determinado como sendo as menores concentrações de óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata*, que foram capazes de impedir que uma solução de sangue alterasse sua cor.²² Todos os dados foram feitos em triplicata.

3.2.5. Atividade antimicobacteriana

Para os testes foram utilizadas as microbactérias *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. kansasii* (ATCC 12478) e *M. avium* (ATCC 25291), que foram obtidas da American Type Collection (ATCC) e mantidas a -80°C. A atividade antimicobacteriana dos óleos essenciais de frutos verdes e maduros de *M.*

paniculata foram avaliada pelo método de microdiluição em caldo, realizado em microplacas. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) corante azul, foi empregada para revelar crescimento de micobactérias usando o método do Resazurin Microtiter Assay (REMA).²¹ Os OEs foram diluídos em série (duplo) com meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco™, Detroit, MI, EUA). O inóculo de micobactéria foi então adicionado para obter concentrações variando de 250 a 2000 µg/mL. O antibiótico isoniazida foi usado como controle positivo em concentrações que variaram de 0,06 a 1,0 µg/mL, enquanto o meio de cultura Middlebrook 7H9 e o inóculo foram usados como solvente, como controle negativo, respectivamente.

3.3 Resultados e Discussão

As extrações dos óleos essenciais dos frutos (Verdes e Maduros) de *Murraya paniculata* forneceram rendimentos de 0,5% e 0,6%, respectivamente. Por CG-EM foram identificados 28 constituintes químicos no óleo essencial dos frutos maduros (total de 95,9%) e 15 constituintes químicos no óleo essencial dos frutos verdes (total de 96,1%). Os tempos de retenção, compostos identificados, índices de retenção e a porcentagem relativa (%) estão apresentados na Tabela 1. Os componentes majoritários no óleo essencial extraído dos frutos maduros (OE-FM) foram: β-cariofileno (**1**) (21,3%), α-ilangeno (**2**) (13,3%), germacreno-D (**3**) (10,9%) e α-zingibereno (**4**) (9,7%) (Figura 2). No óleo essencial dos frutos verdes (OE-FV) os constituintes majoritários identificados foram: sesquiterpeno (**5**) (25,0%), α-zingibereno (**4**) (18,2%), germacreno-D (**3**) (13,1%) e α-copaeno (**6**) (12,7%) (Figura 2).

Relatos anteriores sobre o OE das folhas obtidos de outros espécimes de *M. paniculata* indicaram que os terpenos predominam no óleo essencial em estudo, e que a composição química do óleo essencial varia significativamente dependendo da origem da planta. Por exemplo, o OE de folhas cultivadas em Bangladesh mostrou-se como os sete principais constituintes, óxido de cariofileno, β-cariofileno, espathulenol, β-elemeno, germacreno D, cicloocteno e 4-metileno-6-(1-propenilideno)¹⁶. Enquanto o OE recolhido no Nepal forneceu palmitato de metilo, isospatulenol, (*E, E*)-geranil-linalol, benzoato de benzilo, selin-6-en-4-ol, β-cariofileno, germacreno B, germacreno D e γ-elemeno como principais constituintes¹⁷. Nas montanhas do centro de Cuba os OEs das folhas tiveram como principal constituinte o β-cariofileno¹⁸. Por outro lado, na Nigéria, o OE das folhas apresentou sete constituintes principais, β-ciclo- citral,

salicilato de metila, *trans*-nerolidol, α -cubebeno, (-) - cubenol, β -cubebeno e isogermacreno ¹⁵.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial dos frutos maduros (OE-FM) e frutos verdes (OE-FV) de *Murraya paniculata* (Rutaceae).

RT (min)	Compostos	RI _{exp}	RI _{lit}	%RA	
				FM	FV
27.30	Bicycloelemeno	1334	1336	0.3	1.4
27.75	Isômero elemeno	1341	1344	2.7	
28.28	α -Cubebeno	1351	1352	0.9	6.1
29.51	α -Copaeno	1379	1377	6.1	12.7
30.21	α -Ylangeno	1405	1406	13.3	1.1
30.81	Sesquiterpeno	1415	1417	0.4	25.0
30.94	α -Gurjuneno	1419	1419	0.1	
31.59	β -Carifoleno	1425	1423	21.3	1.1
31.77	Isogermacreno D	1437	1439	0.8	
31.91	β -Guriuneno	1439	1440	0.7	
32.36	γ -Muuroleno	1448	1449	0.4	6.4
32.81	α -Humuleno	1456	1455	5.3	1.0
33.06	Aromadendreno	1465	1463	1.1	
34.02	Germacreno D	1480	1480	10.9	13.1
34.50	α -Zingibereno	1499	1496	9.7	18.2
34.61	Biciclogermacreno	1503	1501	5.3	0.5
34.89	β -Bisaboleno	1508	1506	0.8	1.7
35.58	β -Cadineno	1528	1527	5.5	5.6
35.92	Cadina-1.4-dieno	1534	1533	0.3	
37.62	Germacreno-D-4-ol	1576	1574	1.0	1.0
37.94	Oxido cariofileno	1590	1589	1.2	1.1
38.72	Acetato de laurilo	1608	1606	0.2	
39.57	2-metilbutanoato de octil	1624	1623	0.2	
39.71	Ácido isovalérico éster decílico	1657	1659	0.1	
40.12	τ -Muurolol	1659	1660	0.5	
40.59	α -Cadinol	1662	1663	0.3	

42.80	Seneciato de decilo	1720	1719	4.0	
46.73	Ácido isovalérico éster dodecílico	1844	1845	2.5	
Sequiterpenos de hidrocarbonetos				85.9	94.0
Sequiterpenos oxigenados				3.0	2.1
Outras				7.0	
Total identificado				95.9	96.1

R_lexp: Índice de retenção determinado em relação aos n-alcanos (C₈ – C₂₀) na coluna Rtx-5MS. **R_llit**: Índice de Retenção da Literatura.

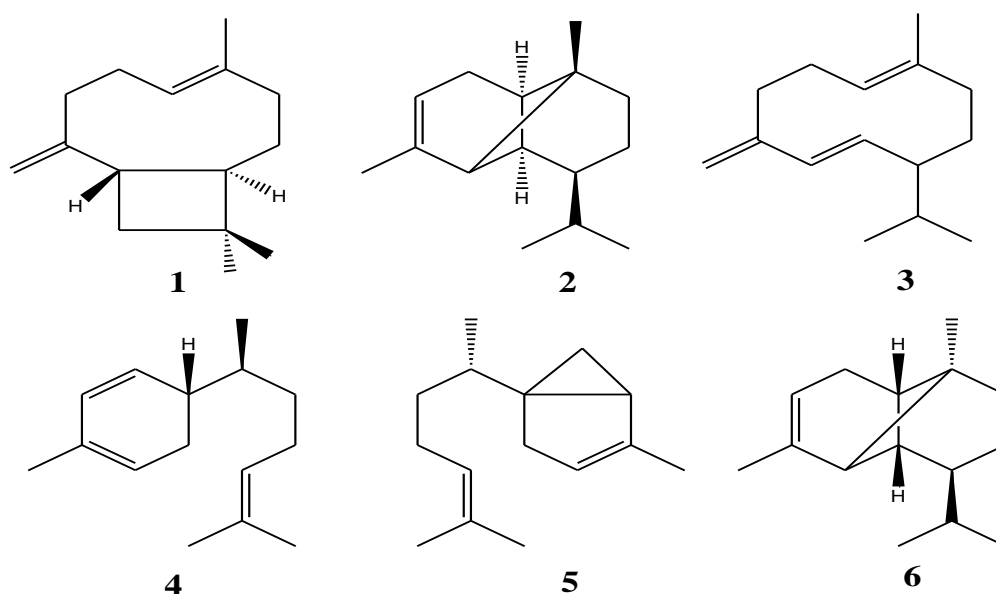


Figura 2. Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais dos frutos (Verdes e Maduros) de *Murraya paniculata*: β-cariofilleno (1), α-Ylangeno (2), germacreno-D (3), α-zingibereno (4), sesquithujeno (5) e α-copaeno (6).

Em particular, Olawore e colaboradores (2005)¹⁵ relatam que os componentes majoritários identificados no OE dos frutos de *M. paniculata* foram β-cariofilleno (43.4%), (-)-zingibereno (18.9%), germacreno D (8.3%), α-copaeno (5.5%) e α-humuleno (5.1%), entretanto, não especificaram quais eram as condições dos frutos coletados. Por este motivo, os autores do presente trabalho decidiram analisar pela primeira vez os perfis químicos entre os OEs extraídos dos frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* coletados em área de Cerrado no interior do estado de Goiás, Brasil. Em comparação com a composição química reportada anteriormente para os frutos de *M. paniculata*¹⁵ as composições agora obtidas para OE-FM e OE-FV ambos, exibem como constituintes majoritários α-copaene, β-cariofileno, germacreno D, α-zingibereno e α-humuleno, porém em diferentes concentrações. É importante destacar que os outros

dois constituintes majoritários de OE-FM e OE-FM, α -ylangeno (13.3%) e sesquiterpenos (25.0%), não foram identificados no óleo essencial dos frutos coletados na Nigéria.

A atividade anticariogênica dos OEs dos frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* foi determinada com a finalidade de verificar sua atividade diante de alguns patógenos orais (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade anticariogênica *in vitro* de óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* contra bactérias orais em estudo.

	CIM	CIM	CIM
Bactéria	Frutos verdes	Frutos maduros	CHD*
<i>Streptococcus mutans</i>	250	250	0.922
<i>S. mitis</i>	200	100	1.844
<i>S. sanguinis</i>	200	200	0.922
<i>S. sobrinus</i>	400	400	0.922
<i>S. salivarius</i>	200	250	0.922

MIC: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); * **CHD:** Dicloridrato de Clorexidina (controle positivo).

Os OEs dos frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* apresentaram moderada atividade inibitória diante de todas as bactérias testadas. É reportado na literatura²³ que amostras que exibiram valores de MIC inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ tiveram atividade antibacteriana considerada boa; de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ moderada; de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ fraca e acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ inativa.

Streptococcus mitis, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* e *S. sobrinus* são bactérias que apresentam patogenicidade diante do esmalte dos dentes e tecido gengival estando diretamente ligadas a cárie e doenças periodontais.²⁴ A placa bacteriana é definida como um biofilme de micro-organismos, contidos em matriz orgânica formada por substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro e por polímeros bacterianos.²⁴

Os OEs dos frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* apresentaram em sua composição química alguns constituintes que já possuem suas atividades antimicrobianas bem descritas na literatura, são eles: β -cariofileno,²⁵ germacreno D,²⁵ α -humuleno²⁶, α -copaeno²⁷ e o α -zingibereno, também identificado como constituinte majoritário no OE de *Guarea kunthiana*²⁸. Este é um fato que pode justificar a moderada

atividade antibacteriana apresentada pelos óleos estudados. Em suma, as plantas continuam sendo promissores alvos de estudos na busca de compostos que possuam atividade anticáries, tendo como enfoque a possibilidade de produção de novos agentes para higiene oral.²⁹

A atividade antibacteriana dos OEs tem sido associada à lipofilicidade de seus constituintes químicos, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos, que são frequentemente os principais químicos dos mesmos³⁰. A lipofilia permite que os óleos essenciais se difundam facilmente pelas membranas celulares e, em seguida, matam os microrganismos afetando sua atividade vias metabólica ou organelas³¹.

Em relação à atividade antimicobacteriana, poucos trabalhos na literatura reportam à aplicação de OE no combate as micobactérias,³² por esta razão os autores deste trabalho também julgaram pertinente a realização desta atividade biológica *in vitro*. Foi investigada a atividade antimicobacteriana dos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* e *M. avium* para determinar as suas concentrações inibitórias mínimas (CIMs, Tabela 3).

A literatura relata que OE com valores de CIM de 500 µg/mL e 250 µg/mL são considerados moderadamente ativos e ativos, respectivamente, e 1000 a 2000 µg/mL pouco ativos contra as micobactérias³³.

Tabela 3. Atividade antimicobacteriana *in vitro* dos OEs de frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata* (CIM = µg/mL) contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* e *M. Avium*.

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>
EO-Frutos verdes	500	2000	250
EO-Frutos maduros	500	2000	250
Isoniazida*	0.06	1	> 1

EO - óleo essencial; * Controle positivo.

As plantas têm se destacado como uma fonte potencial de novos agentes antimicobacterianos³⁴ e, neste cenário, os óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* são dignos de nota, pois apresentaram-se ativos diante do *M. avium*, moderadamente ativos contra *M. tuberculosis* (Tabela 3). Os resultados deste estudo são importantes tendo em vista a resistência desenvolvida pelas bactérias ao uso de

antibióticos e as drogas convencionais empregados no tratamento de doenças como a própria tuberculose.³⁵

A atividade antimicobacteriana apresentada pelos OEs dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* diante de *M. avium* e *M. tuberculosis* pode estar relacionada com a presença de alguns constituintes químicos no óleo, como o α -cubebeno, α -copaeno, α -ylangeno, α -gurjuneno, β -cariofileno, γ -humuleno, bicyclogermacreno e oxido cariofileno que já foram anteriormente identificados no OE dos frutos de *Pterodon emarginatus*³⁶ e que quando testado exibiu promissora atividade contra bactérias do gênero *Mycobacterium*.³⁷ Além disso, estudos mostraram o efeito sinérgico de quaisquer dois ou mais constituintes dos óleos essenciais contra vários patógenos humanos³¹.

3.4. Conclusão

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os OEs dos frutos (Verdes e Maduros) de *Murraya paniculata* apresentaram em sua composição química uma concentração elevada de sesquiterpenos, sendo que os constituintes majoritários foram β -cariofileno, α -Ylangeno, germacreno-D, α -zingibereno, sesquiterpeno e α -copaeno. Este foi o primeiro relato do perfil químico realizado para os óleos essenciais frutos verdes e maduros de *M. paniculata*, demonstrando similaridade entre os dois. Em adição, quando os óleos essenciais foram testados biologicamente, estes demonstraram moderada atividade antibacteriana diante das bactérias do gênero *Streptococcus* responsáveis pela cárie dentária e outras doenças periodontais. OE-FM e OE-FV também foram ativos contra *Mycobacterium avium* e moderadamente ativos contra *Mycobacterium tuberculosis*. As atividades anticariogênica e antimicobacterina realizadas para OE-FM e OE-FV também foram descritas pela primeira vez na literatura. Estes resultados sugerem que moléculas bioativas presentes nos óleos essenciais dos frutos verdes e maduros de *M. paniculata* podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas com atividade antibacteriana. Em suma, são necessários mais estudos para identificar os constituintes químicos ativos de OE-FM e OE-FV.

3.5. Referências Bibliográficas

1. Soares, G. G.; Souza, P. R.; Purger, F. P. C.; Vasconcellos, A. B.; Ribeiro, A. A. Métodos de detecção de cárie. *Revista Brasileira de Odontologia***2012**, *69*, 84. [[Link](#)]
2. Melo, D. C.; Miranda, M. L. D.; Júnior, W. G. F.; Andrade, P. M.; Alcoba, A. E. T.; Silva, T. S.; Casal, C. M.; Martins, C. H. G. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry***2017**, *9*, 55. [[CrossRef](#)]
3. Fernandes, G. F. S.; Chin, C. M.; Santos, J. L. Potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos antituberculose. *Química Nova***2017**, *40*, 572. [[CrossRef](#)]
4. Alves, J. A.; Mantovani, A. L. L.; Martins, M. H. G.; Abrao, F.; Lucarini, R.; Crotti, A. E. M.; Martins, C. H. G. Antimycobacterial activity of some commercially available plant-derived essential oils. *Chemistry of Natural Compounds***2015**, *51*, 353. [[CrossRef](#)]
5. Campelo, L. M. L.; Sá, C. G.; Feitosa, C. M.; Sousa, G. F.; Freitas, R. M. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon* Burn (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais***2013**, *15*, 708. [[CrossRef](#)]
6. Martín, C. M. C.; Gaitén, Y. I. G.; Amado, E. R. Acercamiento al género *Murraya* (Rutaceae) y a la especie *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **2011**, *16*, 408. [[Link](#)]
7. Mesquita, S. G.; Martinez, M. F.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Lieber, S. R.; Lago, J. H. G. Constituintes químicos das folhas de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia***2008**, *18*, 563. [[CrossRef](#)]
8. Saqib, F.; Ahmed, M. G.; Janbaz, K. H.; Dewanjee, S.; Jaafar, H. Z. E.; Haq, M. Z. U. Validation of ethnopharmacological uses of *Murraya paniculata* in disorders of diarrhea, asthma and hypertension. *BMC Complementary and Alternative Medicine***2015**, *15*, 319. [[CrossRef](#)]
9. Souza, A. D. L.; Filho, E. R.; Souza, A. Q. L.; Silva, F. H.; Pereira, J. O. A new guaiane mannoside from a *Eutpa*-like fungus isolated from *Murraya paniculata* in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society***2008**, *19*, 1321. [[CrossRef](#)]

10. Kusuma, S. A. F.; Irma, E. H.; Yuliasih, N. *In vitro* antifungal activity of the orange jasmine (*Murraya paniculata* [L.] Jack.) leaves ethanol extract from Indonesia against *Candida albicans*. *International Journal of Scientific Engineering and Applied Science* **2017**, *3*, 273. [[Link](#)]
11. Sharker, S. M.; Shahid, I. J.; Hasanuzzaman, M. Antinociceptive and bioactivity of leaves of *Murraya paniculata* (L.) Jack, Rutaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 746. [[CrossRef](#)]
12. Zhu, C.; Lei, Z.; Luo, Y. Studies on antioxidative activities of methanol extract from *Murraya paniculata*. *Food Science and Human Wellness* **2015**, *4*, 108. [[CrossRef](#)]
13. Faisal, M.; Sarker, M. M.; Rahman A.; Hossain, A. I.; Rahman, S.; Bashar, A. B. M. A.; Jahan, R.; Rahmatullah, M. *Murraya paniculata* (L.) Jack: a potential plant for treatment of toothache. *Journal of Dentistry, Oral Disorders & Therapy* **2014**, *2*, 1. [[Link](#)]
14. Neta, M. C. S.; Vittorazzi, C.; Guimarães, A. C.; Martins, J. D. L.; Fronza, M.; Endringer, D. C.; Scherer, R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharmaceutical Biology* **2017**, *55*, 190. [[CrossRef](#)]
15. Olawore, N. O.; Ogunwande, I. A.; Ekundayo, O.; Adeleke, K. A. Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). *Flavour and Fragrance Journal* **2005**, *20*, 54. [[CrossRef](#)]
16. Chowdhury, J. U.; Bhuiyan, M. N. I.; Yusuf, M. Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack. *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society* **2008**, *3*, 59. [[CrossRef](#)]
17. Dosoky, N. S.; Satyal, P.; Gautam, T. P.; Setzer, W. N. Composition and biological activities of *Murraya paniculata* (L.) Jack essential oil from Nepal. *Medicines* **2016**, *3*, 1. [[CrossRef](#)]
18. Rodríguez, E. J.; Ramos, G. R.; Heyden, Y. V.; Alfonso, E. F. S.; García, M. J. L.; Hernández, Y. S.; Monteagudo, U.; Morales, Y.; Holgado, B.; Martínez, J. M. H. Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of central Cuba. *Natural Product Communications* **2012**, *7*, 1527. [[PubMed](#)]

19. Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy*, Allured: Card Stream I L, 2007.
20. CLSI 2009. *Susceptibility testing of aerobic bacteria*. Approved standard, 8th ed. CLSI document M7-A8. Wayne, PA: NCCLS, 15p.
21. Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy***2002**, *46*, 3072720. [[CrossRef](#)]
22. Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods***2007**, *42*, 321. [[CrossRef](#)]
23. Carneiro, N. S.; Alves, C. C. F.; Alves, J. M.; Egea, M. B.; Martins, C. H. G.; Silva, T. S.; Bretanha, L. C.; Balleste, M. P.; Micke, G. A.; Silveira, E. V.; Miranda, M. L. D. Chemical composition, antioxidante and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências***2017**, *89*, 1907. [[CrossRef](#)]
24. Estevam, E. B. B.; Miranda, M. L. D.; Alves, J. M.; Egea, M. B.; Pereira, P. S.; Martins, C. H. G.; Esperandim, V. R.; Magalhães, L. G.; Bolela, A. C.; Cazal, C. M.; Souza, A. F.; Alves, C. C. F. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *Revista Virtual de Química***2016**, *8*, 1842. [[CrossRef](#)]
25. Dias, H. J.; Vieira, T. M.; Carvalho, C. E.; Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A. L.; Turatti, I. C. C.; Willrich, G. B.; Groppo, M.; Cunha, W. R.; Martins, C. H. G.; Crotti, A. E. M. Screening of selected plant-derived extracts for their antimicrobial activity against oral pathogens. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine***2017**, *6*, 00188. [[CrossRef](#)]
26. Moreira, R. R. D.; Martins, G. Z.; Botelho, V. T.; Santos, L. E.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L.; Andrade, G.; Martins, C. H. G. Composition and activity against oral pathogens of the essential oil of *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC. *Chemistry & Biodiversity* **2014**, *11*, 438. [[CrossRef](#)]

27. Martins, C. M.; Nascimento, E. A.; Morais, S. A. L.; Oliveira, A.; Chang, R.; Cunha, L. C. S.; Martins, M. M.; Martins, C. H. G.; Moraes, T. S.; Rodrigues, P. V.; Silva, C. V.; Aquino, F. J. T. Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Essential oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, ID 842047, 1. [[CrossRef](#)]
28. Pandini, J. A.; Pinto, F. G. S.; Scur, M. C.; Santana, C. B.; Costa, W. F.; Temponi, L. G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant potential of the essential oil of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Brazilian Journal of Biology* **2018**, 78, 53. [[CrossRef](#)]
29. Mohieldin, E. A. M.; Muddathir, A. M.; Yamauchi, K.; Mitsunaga, T. Anticaries activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Terminalia laxiflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2017**, 27, 611. [[CrossRef](#)]
30. Crevelin, E. J.; Caixeta, S. C.; Dias, H. J.; Groppo, M.; Cunha, W. R.; Martins, C. H. G.; Crotti, A. E. M. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, ID 102317, 1. [[CrossRef](#)]
31. Raut, J. S.; Karuppayil, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* **2014**, 62, 250. [[CrossRef](#)]
32. Alvarenga, R. F. R.; Wan, B.; Inui, T.; Franzblau, S. G.; Pauli, G. F.; Jaki, B. U. Airborne antituberculosis activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *Journal of Natural Products* **2014**, 77, 603. [[CrossRef](#)]
33. Alves, J. A.; Mantovani, A. L. L.; Martins, M. H. G.; Abrao, F.; Lucarini, R.; Crotti, A. E. M.; Martins, C. H. G. Antimycobacterial activity of some commercially available plant-derived essential oils. *Chemistry of Natural Compounds* **2015**, 51, 353. [[CrossRef](#)]
34. Leitão, F.; Leitão, S. G.; Almeida, M. Z.; Cantos, J.; Coelho, T.; Silva, P. E. A. Medicinal plants from open-air markets in the state of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agentes. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, 149, 513. [[CrossRef](#)]

35. Gómez-Cansino, R.; Guzmán-Gutiérrez, S. L.; Campos-Lara, M. G.; Espitia-Pinzón, C. I.; Reyes-Chilpa, R. Natural compounds from Mexican plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2017**, *89*, 31. [[CrossRef](#)]
36. Alves, S. F.; Borges, L. L.; Paula, J. A. M.; Vieira, R. F.; Ferri, P. H.; Couto, R. O.; Paula, J. R.; Bara, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2013**, *23*, 224. [[CrossRef](#)]
37. Machado, R. R. P.; Dutra, R. C.; Raposo, N. R. B.; Lesche, B.; Gomes, M. S.; Duarte, R. S.; Soares, G. L. G.; Kaplan, M. A. C. Interferometry as a tool for evaluating effects of antimicrobial doses on *Mycobacterium bovis* growth. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 829. [[CrossRef](#)]

4 CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a revista Food Science and Technology)

Composição química do óleo essencial das folhas de *Murraya paniculata* (L) Jack e sua aplicação no controle biológico *in vitro* do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Resumo: Além do valor como recurso terapêutico, as plantas medicinais também possuem potencial para serem utilizadas como fonte de princípios ativos contra fitopatógenos. Em particular, a presença e o crescimento de fungos podem causar deterioração, resultando redução da qualidade e da quantidade de alimentos. Este trabalho objetivou avaliar o efeito do óleo essencial de folhas de *Murraya paniculata* (ML-OE) sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, fungos o com alto potencial de danos para as culturas principalmente da soja. O óleo essencial de folhas de *M. paniculata* foi obtido por hidrodestilação por aparelho tipo Clevenger, enquanto sua composição química foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização por chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os compostos β -cariofileno (23,8%), α -zingibereno (21,0%) e β -cubebeno (10,2%) foram os principais constituintes encontrados na ML-OE. A atividade antifúngica *in vitro* mostrou que o ML-EO na dose de 300 μ L exibiu 91,2% de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. Este é o primeiro relato da atividade antifúngica com óleo essencial de *M.paniculata* contra *S. sclerotiorum* os resultados sugerem que o OE avaliado tem bom potencial para controlar este fungo fitopatogênico.

Palavras-chave: *Murraya paniculata*, óleo essencial, soja, *Sclerotinia sclerotiorum*, controle alternativo, doença de plantas.

4.1 Introdução

No contexto mundial e nacional, o cultivo da soja está entre as atividades produtivas mais expressivas economicamente e isso pode estar relacionado aos diversos fatores, como o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, fazendo com que o Brasil se torne atualmente, o segundo maior produtor e exportador mundial. Entretanto, entre os fatores que contribuem negativamente para a variação desta produtividade, estão as doenças de plantas, sendo o mofo branco uma das principais que incidem nesta cultura (Pereira et al., 2012).

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é o agente causador da doença conhecida como mofo branco, está entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) entre outras (Dilley et al., 2014). O mofo branco é disseminado a partir de sementes infectadas, porque o patógeno sobrevive no solo por um longo período, por meio de estruturas denominadas escleródios, desde que se tenham condições ambientais favoráveis, tais como, temperatura, umidade do solo e profundidade em que o escleródio encontra-se no solo, fazendo com que a população do patógeno aumente a cada plantio com culturas da mesma espécie hospedeira (Dilley et al., 2014).

O alto índice de doenças causadas por fitopatógenos faz o Brasil ser responsável por consumir a cerca de 50% da quantidade de defensivos agrícolas utilizados na América Latina. Por este motivo, é considerado um dos maiores consumidores do mundo gastando anualmente cerca de 2,5 milhões de dólares com a aquisição destes produtos (Fonseca et al., 2015). O uso de defensivos agrícolas acarreta consequências graves como o desequilíbrio ambiental e principalmente a contaminação de alimentos, animais e reservas hídricas, ocasionando redução na qualidade e na expectativa de vida da população (Fonseca et al., 2015).

Pesquisas visando ao controle alternativo de pragas e doenças, principalmente daquelas que provocam danos econômicos a agricultura, através do emprego de OEs extraídos de plantas têm aumentado consideravelmente nos últimos anos e revelado potencial promissor no controle de fitopatógenos como, por exemplo, do próprio fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Alam et al., 2017; Silva et al., 2018).

Murraya paniculata é pertencente à família Rutaceae, uma árvore nativa da Índia que foi introduzida no Brasil, e é largamente utilizada em arborização e em jardins da cidade de São Paulo. Esta espécie é considerada medicinal nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e também na China e Indonésia. Nesses países, as folhas e raízes

são utilizadas para o tratamento de problemas intestinais, de reumatismo e tosse (Mesquita et al., 2008). Em adição, esta é a primeira vez que se avalia a atividade *in vitro* anti-*Sclerotinia sclerotiorum* do óleo essencial das folhas de *M. paniculata*.

Estudos realizados por este grupo de pesquisa têm como objetivo analisar a composição química e as atividades biológicas de óleos essenciais (Estevam et al., 2017; Estevam et al., 2018), e este, especificamente, aborda a composição química e a atividade antifúngica das folhas *in vitro* do OE de *M. paniculata* contra *S. sclerotiorum*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

As folhas de *M. paniculata* foram coletadas em junho de 2017 às 8h, em Rio Verde, Goiás, Brasil, no campus do Instituto Federal Goiano - Rio Verde. A planta foi identificada pela botânica Erika Amaral e uma amostra foi depositada no Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto no número exsicata HJ 28760/MP.

4.2.2 Extração de óleo essencial

Amostras de folhas de *M. paniculata* foram submetidas ao processo de hidrodestilação por 3 horas por aparelho tipo Clevenger. Para realizar a análise, 300 g de material vegetal foram divididos em três amostras de 100 g, e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual das amostras de óleo essencial, os vestígios de água remanescente nos óleos foram removidos com sulfato de sódio anidro e, em seguida, seguidos por filtração. O procedimento de extração foi feito em triplicata. Os Óleos isolados foram armazenados sob refrigeração até a análise e teste. Os rendimentos (p/p) foram calculados a partir do peso de folhas frescas e inflorescências e expressos como a média de análises em triplicado.

4.2.3 Identificação da composição química do óleo essencial

Para análises dos constituintes químicos, foi utilizado Cromatografia de gás (CG), as análises foram realizadas por um cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010 Plus equipado com um amostrador automático AOC-20s e equipado com DIC e um processador de manipulação de dados. Uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm d.i.; espessura de filme de 0,25 µm) foi empregada. As condições de operação foram as seguintes: temperatura da

coluna programada para subir de 60 a 240°C a 3°C/min e, em seguida, manter a 240°C por 5 min; gás transportador = He (99,999%), a 1,0 mL/min; modo de injeção; volume de injeção, 0,1 µL (razão de separação de 1:10); e temperaturas de injetor e detector = 240 e 280°C, respectivamente. Concentrações relativas de componentes foram obtidas pela normalização da área do pico (%). Áreas relativas foram a média de análises tri-compostas de CG-DIC

As análises de CG-EM foram realizadas por um sistema Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Quioto, Jap) equipado com um amostrador automático AOC-20i. A coluna era capilar de sílica fundida RTX-5MS (Restek Co., Bellefonte, PA, EUA) (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 de espessura de filme). O modo de ionização de elétrons ocorreu a 70 eV. O hélio (99,999%) foi empregado como gás carreador a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 0,1 µL (razão de divisão de 1:10). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram ajustadas em 240 e 280°C, respectivamente. O programa de temperatura do forno foi o mesmo utilizado para o CG. Os espectros de massa foram tirados com um intervalo de varredura de 0,5 s, na faixa de massa de 40 a 600 Da.

A identificação de componentes voláteis de folhas de *M. paniculata* (Tabela I) foi baseada em seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS sob as mesmas condições operacionais que no caso de CG em relação a uma série homóloga de n-alcenos (C₈ -C₂₀). As estruturas foram computadorizadas com as bibliotecas de espectros Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2 e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams 2007).

4.2.4 Atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais das folhas de *M. paniculata* contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* Ss12 (BRM 29673) foi fornecido pela Embrapa Arroz e Feijão, cuja sede é em Santo Antônio de Goiás, GO, Brasil. Os ensaios foram realizados no laboratório de microbiologia agrícola do IF Goiano - Campus Rio Verde e a atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *M. paniculata* foi avaliada de acordo com o método de disco-difusão descrito por Xavier et al., (2016), As doses de óleo essencial foram de 12,5 a 300 µL para ML-OE. Controles negativos foram postos sem adição de OE (testemunha) enquanto o controle positivo foi o fungicida Frownicide 500 SC, a 10 µg/mL do princípio ativo. Placas de Petri foram esterilizadas e preparadas com meio de cultura BDA. Após a solidificação do meio, os óleos essenciais, em doses

previamente mencionadas, foram adicionados e untados na superfície do prato com a ajuda de uma espátula de Drigalski. Posteriormente, discos de meio BDA de 5 mm de diâmetro com micélio com 10 dias de idade foram colocados no centro das placas. Em seguida, eles foram incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e o crescimento micelial foram medidos diariamente, até o crescimento total do fungo nas placas de controle.

O tratamento foi realizado em quadruplicado e o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância pelo software ASSISTAT.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$ICM (\%) = \frac{(\text{controle do crescimento} - \text{tratamento do crescimento})}{\text{controle do crescimento}} \times 100$$

4.3. Resultados e Discussão

A extração do OE das folhas de *Murraya paniculata* (ML-OE) forneceu rendimento de 0.6%. Por CG-EM e CG-DIC foram identificados 16 constituintes químicos no óleo essencial das folhas, correspondendo ao total de 97.7%. Os tempos de retenção, compostos identificados, índices de retenção e a porcentagem relativa (%) estão apresentados na Tabela I. Os componentes majoritários identificados no ML-EO foram: β -carariofileno (**1**) (23.8%), α -zingibereno (**2**) (21.0%) e β -cubebeno (**3**) (10.2%) (Figure 1).

Tabela I– Composição química do óleo essencial de folhas de *M. paniculata* coletadas em Rio Verde, Goiás, Brasil

Compostos	RI _{exp}	RI _{lit}	RA %	Identificação
α -Ylangeno	1365	1372	5.6	RL MS
α -Copaeno	1375	1376	1.6	RL MS
β - Bourboneno	1377	1384	0.6	RL MS
β-Cubebeno	1385	1390	10.2	RL MS
β-Cariofileno	1415	1418	23.8	RL MS
β -Humuleno	1446	1440	6.4	RL MS
Aromadendreno	1461	1464	1.8	RL MS
Germacreno D	1476	1480	9.8	RL MS

α-Zingibereno	1492	1495	21.0	RL MS
β -Bisaboleno	1501	1509	1.2	RL MS
<i>trans</i> -Nerolidol	1557	1565	1.4	RL MS
Spathulenol	1576	1576	2.5	RL MS
Oxido cariofileno	1581	1581	1.5	RL MS
t-Cadinol	1634	1640	0.4	RL MS
10-epi- α -Muurolol	1640	1641	2.6	RL MS
α -Cadinol	1654	1653	1.0	RL MS
Sesquiterpeno de hidrocarbonetos			88.3	
Sesquiterpenos oxigenados			9.4	
Total			97.7	

RT: tempo de retenção; R_lexp: Índice de retenção determinado em relação aos n-alcacos (C₈ – C₂₀) na coluna Rtx-5MS; R_llit: Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); RA%: área relativa (área do pico em relação à área total do pico no cromatograma CG-DIC), média de três repetições; RL: comparação do R_lexp com a literatura (Adams, 2007); CG-EM: comparação dos espectros de massa com os das bibliotecas Wiley 7. NIST 08. e FFNSC 12, bem como com as da literatura (Adams, 2007).

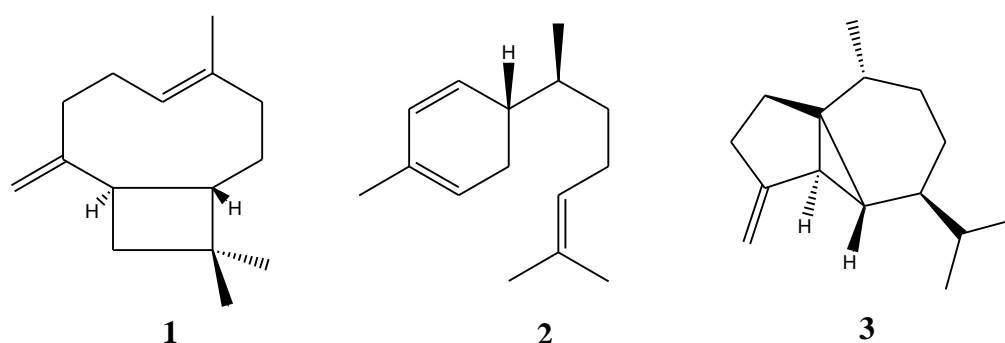


Figura 1 – Estruturas químicas dos principais constituintes identificados no óleo essencial de folhas de *M. paniculata*: β -cariofileno (1), α -zingibereno (2) e β -cubebeno (3).

Relatos anteriores sobre o OE das folhas obtidas de outros espécimes de *M. paniculata* indicaram que os terpenos predominam no óleo, e que a composição química do OE varia significativamente dependendo da origem da planta. Por exemplo, o OE das folhas cultivadas em Bangladesh mostrou como os sete constituintes principais, óxido de cariofileno, β -cariofileno, espatulenol, β -elemeno, germacreno D, cicloocteno e 4-metileno-6- (1-propenilideno) (Chowdhury et al., 2008), enquanto o óleo essencial coletado no Nepal forneceu palmitato de metila, isospatulenol, (*E, E*)-geranil linalol, benzoato de benzila, selin-6-en-4-ol, β -cariofileno, germacreno B, germacreno D e γ -

elemento como constituintes principais (Dosoky et al., 2016), e o das montanhas do centro de Cuba mostrou como o principal constituinte o β -cariofileno (Rodríguez et al., 2012).

Por outro lado, na Nigéria, o OE de folhas apresentou sete constituintes principais, β -ciclocitáριο, salicilato de metila, trans-nerolidol, α -cubebeno, (-) - cubenol, β -cubebeno e isogermacreno (Olawore et al., 2005). Especificamente no Brasil, o OE das folhas de *M. paniculata* coletadas no estado do Espírito Santo, exibiu como constituintes majoritários os terpenos β -caryophyllene e α -zingiberene (Neta et al., 2017).

A composição química obtida para o OE das folhas de *M. paniculata* ocorrente no estado de Goiás foi semelhante à relatada anteriormente por Neta et al., (2017), diferindo apenas pela presença do β -cubebene (10.2 %) identificado como terceiro componente majoritário do ML-OE e ausente no OE das folhas do espécime ocorrente no estado do Espírito Santo.

O potencial antifúngico dos OE contra fitopatógenos tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores em todo o mundo (Silva et al., 2018; Romagnoli et al., 2010), uma vez que esses óleos podem atuar como biofungicidas, tornando uma alternativa aos fungicidas químicos. Por este motivo, avaliou-se a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de ML-OE contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. O ML-EO inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* de maneira dose-dependente. As porcentagens de inibição do crescimento micelial (ICM) do OE das folhas de *M. paniculata* são mostradas no gráfico I.

Os resultados da análise de inibição do crescimento micelial mostraram o promissor potencial antifúngico *in vitro* do OE extraído das folhas de *M. paniculata*. O estudo das médias encontradas pelo teste de Scott-Knott revelou que doses acima de 12,5 μ L do OE das folhas diferem estatisticamente do fungicida comercial Frownicide 500 SC, que foi utilizado como controle positivo (Gráfico I). O ML-OE das doses 100, 200 e 300 μ L resultou em 78,4%, 81,3% e 91,2% de inibição do crescimento micelial, respectivamente. Isto demonstrou a toxicidade deste óleo essencial a uma dose acima de 100 μ L contra *S. sclerotiorum*.

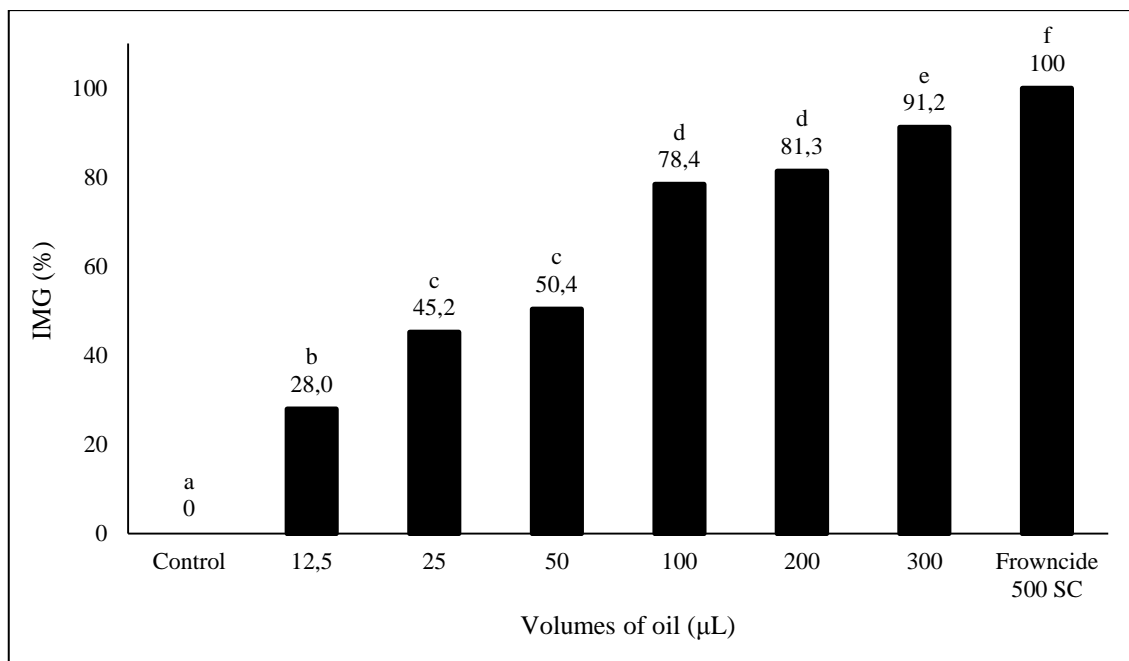


Gráfico I - Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes doses de óleo essencial de folhas de *M. paniculata* (ML-OE). Meios seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

A promissora atividade antifúngica *in vitro* do OE das folhas de *M. paniculata* pode ser justificada pela presença dos constituintes químicos majoritários o β -cariofileno (23.8%), α -zingibereno (21.0%), and β -cubebeno (10.2%) no óleo. Este fato é relevante, tendo em vista que estes três constituintes majoritários já possuem sua ação antifúngica reportada na literatura (Pereira et al., 2017; Yamamoto-Ribeiro et al., 2013; Xavier et al., 2016). Outros fatores determinantes que justificam a boa atividade antifúngica exibida pelo ML-OE são composição, grupos funcionais presentes nos componentes ativos e suas interações sinérgicas (Chouhan et al., 2017).

Os OEs são conhecidos pelo caráter hidrofóbico, facilitando sua interação com estruturas lipídicas, aumentando a permeabilidade celular, provocando danos irreversíveis à célula e conseqüentemente aos microrganismos (Almeida et al., 2012). Este mecanismo de ação justifica também os resultados satisfatórios do OE das folhas de *M. paniculata* diante do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. Além disso, o OE das folhas de *M. paniculata* foi mais ativo que os OEs de *Cardiopetalum calophyllum* e *Psidium guajava*, outra espécie encontrada no Cerrado em Goiás, i. e., 300 deste último inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 87,6% e 90,0%, respectivamente (Xavier et al. 2016; Silva et al., 2018).

4.4 Conclusão

Em resumo, este estudo mostra que o OE de folhas de *M. paniculata* possui atividade antifúngica satisfatória *in vitro* contra *S. sclerotiorum*, um fungo patogênico que causa danos a muitas plantas de interesse econômico. Os resultados, desta pesquisa revelam que, existe uma boa perspectiva de usar esse OE experimentalmente para controle de fitopatógenos tanto em condições de estufa como em condições de campo. Em termos de composição química, os principais constituintes do ML-OE foram o β -cariofileno, o α -zingibereno e o β -cubebeno. Em conclusão, a atividade biológica contra *S. sclerotiorum* do ML-OE provavelmente se origina do sinergismo dos compostos que constituem o óleo.

4.5 Referências Bibliográficas

- Adams R. P. (2007). In Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 804 p.
- Alam, A., Tripathi, A., Sharma, V., & Sharma, N. (2017). Essential oils: a novel consumer and eco-friendly approach to combat postharvest phytopathogens. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 11(1), 1-16. <http://dx.doi.org/10.9734/JABB/2017/30212>.
- Almeida, L. F. D., Cavalcanti, Y. W., Castro, R. D., & Lima, E. O. (2012). Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(4), 649-655. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400012>.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils – present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), E58. <http://dx.doi.org/10.3390/medicines4030058>.
- Chowdhury, J. U., Bhuiyan, Md. N. I., & Yusuf, M. (2008). Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata*

(L.)Jack. *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 3, 59-63.
<http://dx.doi.org/10.3329/bjp.v3i2.841>.

Dildey, O. D. F., Barbian, J. M., Gonçalves, E. D. V., Broetto, L., Ethur, L. Z., Kuhn, O. J., & Bonett, L. P. (2014). Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. *Revista Brasileira de Biociências*, 12(3), 132-136.

Dosoky, N. S., Satyal, P., Gautam, T. P., & Setzer, W. N. (2016). Composition and Biological Activities of *Murraya paniculata* (L.) Jack Essential Oil from Nepal. *Medicines*, 3(1), 1-10.<http://dx.doi.org/10.3390/medicines3010007>.

Estevam, E. B. B., Deus, I. P. B., Silva, V. P., Silva, E. A. J., Alves, C. C. F., Alves, J. M., Cazal, C. M., Magalhães, L. G., Pagotti, M. C., Esperandim, V. R., Souza, A. F., & Miranda, M. L. D. (2017). *In vitro* antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil from *Protium ovatum* leaves (Burceraceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 3005-3013.
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170310>.

Estevam, E. B. B., Alves, C. C. F., Esperandim, V. R., Cazal, C. M., Souza, A. F., & Miranda, M. L. D. (2018). Chemical composition, anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* (BURSERACEAE). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(1), 1-8.
<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018794>.

Fonseca, M. C. M., Lehner, M. S., Gonçalves, M. G., Paula Júnior, T. J., Silva, A. F., Bonfim, F. P. G., & Prado, A. L. (2015). Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17(1), 45-50. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_170.

- Mesquita, S. G., Martinez, M. F., Romoff, P., Fávero, O. A., Lieber, S. R., & Lago, J. H. G. (2008). Constituintes químicos das folhas de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 563-568. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400011>.
- Neta, M. C. S., Vittorazzi, C., Guimarães, A. C., Martins, J. D. L., Fronza, M., Endringer, D. C., & Scherer, R. (2017). Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 190-197. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1254251>.
- Olawore, N. O., Ogunwande, I. A., Ekundayo, O., & Adeleke, K. A. (2005). Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 54-56. <https://doi.org/10.1002/ffj.1365>.
- Pereira, D. G., Sedyama, T., Reis, M. S., Cruz, C. D., Gomes, J. L. L., & Teixeira, R. C. (2012). Avaliação da severidade do oídio [*Erysiphe difusa* (U. Braun & S. Takam)] em genótipos de soja, em condições de campo. *Revista Caatinga*, 25(3), 25-30.
- Pereira, F. G., Marquete, R., Domingos, L. T., Rocha, M. E. N., Ferreira-Pereira, A., Mansur, E., & Moreira, D. L. (2017). Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2817-2824. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720170339>.
- Rodríguez, E. J., Ramis-Ramos, G., Heyden, Y. V., Simó-Alfonso, E. F., Lerma-García, M. J., Saucedo-Hernández, Y., Monteagudo, U., Morales, Y., Holgado, B., & Herrero-Martínez, J. M. (2012). Chemical composition, antioxidante properties and

antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of central Cuba. *Natural Product Communications*, 7(11), 1527-1530. PMID: 23285823.

Romagnoli, C., Andreotti, E., Maietti, S., Mahendra, R., & Mares, D. (2010). Antifungal activity of essential oil from fruits of Indian *Cuminum cyminum*. *Pharmaceutical Biology*, 48(7), 834-838. <https://doi.org/10.3109/13880200903283715>.

Silva, E. A. J., Silva, V. P., Alves, C. C. F., Alves, J. M., Souchie, E. L., & Barbosa, L. C. A. (2018). Chemical composition of the essential oil of *Psidium guajava* leaves and its toxicity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(2), 865-874. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p865>.

Xavier, M. N., Alves, J. M., Carneiro, N. S., Souchie, E. L., Silva, E. A. J., Martins, C. H. G., Ambrosio, M. A. L. V., Egea, M. B., Alves, C. C. F., & Miranda, M. L. D. (2016). Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. *Revista Virtual de Química*, 8(5), 1433-1448. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160101>.

Yamamoto-Ribeiro, M. M. G., Grespan, R., Kohiyama, C. Y., Ferreira, F. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., Filho, B. A. A., Mikcha, J. M. G., & Junior, M. M. (2013). Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Chemistry*, 141, 3147-3152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.144>.

5. CAPÍTULO III

(De acordo com as normas da revista Australian Journal of Crop Science)

Atividade leishmanicida e antioxidante *in vitro* de óleos essenciais de diferentes partes de *Murraya paniculata* (L.) Jack: uma espécie de Rutaceae ocorrente no cerrado brasileiro.

Resumo - Na medicina popular brasileira, a espécie *Murraya paniculata* tem sido usada no tratamento de distúrbios intestinais, reumatismo e tosse. Este trabalho tem como objetivo investigar as atividades leishmanicida e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) de folhas de *M. paniculata* e frutos (maduros e verdes). Os antioxidantes naturais podem ser muito benéficos para melhorar a qualidade de vida, pois são capazes de proteger o corpo contra os danos causados pelos radicais livres e, conseqüentemente, impedir ou adiar o início de seus ciclos de muitas doenças. Uma das técnicas que têm sido amplamente utilizado para a detecção de compostos antioxidantes é o método baseado na eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Sendo considerado fácil, preciso, rápido, simples, econômico e apropriado para determinar a atividade antioxidante de substâncias puras e misturas complexas, como os OEs. Assim, o potencial antioxidante dos OEs foi avaliado pelo método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). OEs de folhas e frutos de *M. paniculata* apresentaram baixo potencial antioxidante, uma vez que os valores de EC₅₀ foram superiores a 700 µg/mL. Vários estudos afirmam que OEs de plantas apresentam promissora atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*. Em relação a esta atividade, os OEs das folhas foi altamente ativo (IC₅₀ = 7,33 ± 2,07 µg/mL) enquanto óleos dos frutos maduros e verdes foram ativos, com valores de IC₅₀ = 30,77 ± 2,07 µg/mL e 13,04 ± 1,64 µg/mL, respectivamente. As análises revelaram que os principais componentes presente nos OEs de *M. paniculata* foram sesquiterpenos (25,0%), trans-β-cariofileno (23,8%), α-zingibereno (21,0%), α-ylangeno(13,3%), germacreno D (13,1%), α-copaeno (12,7%) e β-cubebeno (10,2%). As atividades leishmanicida e antoxidante *in vitro* do OEs de *M. paniculata* foram descritas pela primeira vez na literatura.

Palavras-chave: *Murraya paniculata*, óleos essenciais, *Leishmania amazonensis*, DPPH •, Cerrado

5.1 Introdução

Em virtude da grande diversidade, o Cerrado brasileiro é considerado a savana de maior riqueza biológica mundial e ocupa o segundo lugar na lista de biomas brasileiros. Esforços fortes e importantes foram feitos para preservar esse patrimônio natural, já que se estende por mais de 25% do território brasileiro e é o segundo maior bioma da América do Sul (a Mata Atlântica ocupa o primeiro lugar). Compreende 4.400 plantas endêmicas que correspondem a 1,5% da flora endêmica global e 11.806 espécies de plantas que representam 5% da biodiversidade mundial (Gonçalves et al., 2016).

Vale ressaltar que mais estudos são necessários para desenvolver o setor que produz OEs, associando a preservação do Cerrado, exploração sustentável de produtos florestais e inclusão social de populações que dependem da produção e exploração florestal.

Grande número de plantas encontradas no bioma Cerrado é responsável pela síntese de metabólitos secundários antioxidantes que absorvem na faixa de 300 a 400 nm. É significativamente aumentada pela radiação UV e fornece alto nível de proteção contra oxidantes nocivos gerados pelo calor ou pela luz (Morais et al., 2006). Além disso, plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas como antioxidantes na medicina tradicional. Suas características terapêuticas são principalmente apoiadas por sua capacidade de eliminação de radicais livres, uma vez que os radicais podem estar envolvidos em várias doenças (Chiraget et al., 2013). Câncer, enfisema, arteriosclerose e artrite têm sido correlacionados com o estresse oxidativo. Em geral, organismos têm sido protegidos contra danos causados por radicais livres de enzimas, como o superóxido dismutase e catalase, e por alguns compostos, como ácido ascórbico, tocoferol e glutathione (Meena et al., 2012).

Quando mecanismos de proteção antioxidante se tornam ineficientes como resultado da idade, pode ocorrer deterioração das funções fisiológicas, levando a doenças e aceleração do processo de envelhecimento. No entanto, suplementos alimentares antioxidantes podem ser usados para ajudar o corpo a mitigar o dano oxidativo (Yang et al., 2000). Antioxidantes têm sido normalmente aplicados a óleos e alimentos gordurosos para retardar sua autoxidação. Alguns antioxidantes sintéticos, como o BHA, o BHT, o TBHQ e o PG, são tóxicos em altas doses, embora tenham sido frequentemente aplicados à comida. Como resultado, pesquisas sobre antioxidantes naturais aumentaram muito ultimamente (Andrade et al., 2013).

Essas vantagens justificam o crescente interesse dos pesquisadores no desenvolvimento de substâncias antioxidantes, principalmente de produtos naturais, como as plantas. Uma das técnicas utilizadas para detectar a capacidade antioxidante de vários compostos é o método baseado na eliminação do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A molécula DPPH • tem sido bem conhecida como um radical livre orgânico estável, que apresenta muitas vantagens, como boa estabilidade na ausência de luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade. O método DPPH • tem sido utilizado a cerca de 90% dos estudos preliminares que visam avaliar a atividade antioxidante de substâncias puras, bem como misturas e matrizes complexas. Apesar de possibilitar a avaliação da capacidade antioxidante, esta não deve ser a única metodologia utilizada para esse fim; outros métodos são necessários para caracterizar completamente um composto como antioxidante (Oliveira, 2015).

Como os radicais livres são moléculas com elétrons desemparelhados, eles são instáveis e bastante reativos, mas o DPPH •, pela sua estrutura química, é um radical livre estável com três anéis aromáticos que confere o efeito de ressonância importante para estabilizar sua carga eletrônica. A estabilização do DPPH também tem sido atribuída ao deslocamento de elétrons não pareados nele, atraídos por três grupos de NO₂ e por dois átomos de nitrogênio, que também permitem que os elétrons se desloquem (Oliveira, 2015).

DPPH • é roxo ou violeta pela localização do elétron livre em sua molécula; A absorção ocorre em soluções de etanol ou metanol a um comprimento de onda de 515-520 nm. Qualquer substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para uma molécula receptiva, como o DPPH, que aceita um átomo de hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética estável e originar a forma reduzida do DPPH-H. Nesta forma, a solução violeta se transforma em amarelo-pálido ou violeta-claro depois de algum tempo. Alterações na cor do escuro ao violeta-claro, resultado da diminuição da absorbância do DPPH •, podem ser monitoradas por um espectrofotômetro UV-visível para determinar a capacidade antioxidante. Esse monitoramento deve ser sempre realizado no escuro, pois a luz é um fator que interfere diretamente na reação do DPPH • com determinada substância e leva à diminuição da absorbância e, conseqüentemente, afeta os resultados finais (Oliveira, 2015).

A leishmaniose é uma doença tropical causada por um parasita intracelular, um protozoário do gênero *Leishmania*, cujo vetor é flebotomíneo, um inseto pertencente a ordem Diptera. No Brasil, esse mosquito é chamado de mosquito palha (Blanco et al., 2017). A apresentação clínica da doença depende da complexidade da interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o tipo de protozoário. Existem três formas diferentes de leishmaniose: cutânea, mucocutânea e visceral (a mais séria) (Andrade et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que seja a segunda doença transmitida por insetos que mata o maior número de pessoas no mundo. Em relação à sua ocorrência geográfica, a leishmaniose é classificada em dois tipos: o “velho mundo” ocorre na Ásia, África, região do Mediterrâneo e Oriente Médio, e a leishmaniose do “novo mundo” é encontrada na América Central, América do Sul e no sul. Texas (Blanco et al., 2017).

Neste contexto, as plantas são fontes valiosas para manter a saúde humana. Seu uso tem sido enfatizado ultimamente, uma vez que vários estudos de produtos terapêuticos de plantas medicinais foram realizados. A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que as plantas medicinais são as melhores fontes de uma grande variedade de medicamentos e que 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguns sintomas dolorosos ou desagradáveis (Dutra et al., 2009). Vale ressaltar que a seleção de plantas que produzem OEs tem sido foco de estudos relevantes, uma vez que esses óleos têm demonstrado promissora atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* (Andrade et al., 2016).

Óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de plantas são naturalmente voláteis e constituem uma mistura complexa de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, que são responsáveis pelo forte odor dos óleos. Sua extração pode ser realizada por diversos métodos, como destilação a vapor e hidrodestilação, que têm sido frequentemente utilizados em laboratórios de produtos naturais (Pandey e Singh, 2017). Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de partes distintas de plantas; eles têm composição química complexa e fornecem vantagens adaptativas às plantas em seu ambiente. A composição química dos óleos voláteis varia entre espécies e partes de plantas, uma vez que qualquer espécie pode ser afetada por seu local de cultivo, condições de colheita, estabilização e armazenamento, além de fatores bióticos e abióticos (Miranda et al., 2016).

Murraya paniculata, pertencente à família Rutaceae, é uma árvore nativa da Índia que foi trazida para o Brasil, onde tem sido amplamente utilizada para arborização urbana em São Paulo, SP. Esta espécie é considerada medicinal em regiões tropicais e subtropicais asiáticas, como a China e a Indonésia. Nesses países, suas folhas e raízes têm sido usadas para tratar desordens intestinais, reumatismo e tosse (Mesquita et al., 2008). Portanto, este trabalho teve por objetivo determinar, pela primeira vez, as atividades, antioxidante e a leishmanicida *in vitro* de OEs de folhas e frutos (maduros e verdes) de *M. paniculata* (fig. 1).

5.2 Resultados e Discussão

Para obtenção dos Constituintes químicos dos OEs das folhas, frutos maduros e verdes de *M. paniculata* coletada em Rio Verde, Goiás, Brasil, utilizou-se um processo de hidrodetilação em que foram obtidos com rendimento de 0,7, 0,5 e 0,6% (p/p), respectivamente.

Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa - detector de ionização por chama (CG-DIC) - espectrometria de massa (CG-EM). Os três principais compostos identificados no óleo essencial das folhas são *trans*- β -cariofileno (23.8%, **1**), α -zingibereno (21.0%, **2**), e β -cubebeno (10.2%, **3**). Os principais componentes dos OEs de frutos verdes são sesquiterpeno (25.0%, **4**), α -zingibereno (18.2%), germacreno D (13.1%, **5**), e α -copaeno (12.7%, **6**). Enquanto os OEs dos frutos maduros são compostos principalmente por *trans*- β -cariofileno (23.1%), α -ylangeno (13.3%, **7**), germacreno D (10.9%), e α -zingibereno (9.7%) (Tabela 1 e Fig. 2).

Relatos anteriores mostram que o OE das folhas de *M. paniculata* de outros espécimes, indicaram a predominância dos terpenos em sua composição e que sua composição química varia significativamente, dependendo da origem da planta. Por exemplo, o OE de folhas de plantas cultivadas em Bangladesh tinha os seguintes sete constituintes principais: oxido cariofileno, β -cariofileno, spathulenol, β -elemeno, germacreno D, cicloocteno e 4-metileno-6-(1-propenilideno) (Chowdhury et al., 2008), Considerando que o OE recolhido no Nepal forneceu: metil palmitate, isospathulenol, (*E,E*)-linalol de geranyl, benzoato de benzil, selin-6-eno-4-ol, β -cariofileno, germacreno B, germacreno D e γ -elemeno como seu principal constituents (Dosoky et al., 2016).

Enquanto, o OE de folhas de montanhas no centro de Cuba continha, em sua composição: β -cariofileno encontrado como único principal constituinte (Rodríguez et al., 2012). No entanto, na Nigéria, o OE das folhas, tinham sete componentes principais: β -

ciclocitral, salicilato de metila, trans-nerolidol, α -cubebeno, (-)-cubenol, β -cubebeno and isogermacreno (Olawore et al., 2005). Especificamente, Olawore e collaborators (2005) relataram que os principais componentes, encontrados nos OEs de frutos de *M. paniculata*: β -cariofileno (43.4%), (-)-zingibereno (18.9%), germacreno D (8.3%), α -copaeno (5.5%) e α -humuleno (5.1%), embora não mencionassem as condições de maturação dos frutos.

Portanto, o estudo descrito por este trabalho é pioneiro na análise de perfis químicos de OE extraídos de *M. paniculata* frutos (Maduros e Verdes) coletados no Cerrado do estado de Goiás, Brasil. Em comparação com a composição química previamente descrita de frutos de *M. paniculata*, as composições de OE de frutos maduros e verdes de *M. paniculata* encontradas neste estudo foram semelhantes, uma vez que seus principais constituintes também foram encontrados: α -copaene, β -cariofileno, germacreno D, α -zingibereno e α -humuleno, embora as concentrações fossem diferentes (Olawore et al., 2005).

Vale ressaltar que α -ylangeno (13,3%) e sesquiterpeno (25,0%), outros constituintes majoritários dos OEs de frutos (Maduros e Verdes), não foram encontrados no OE de frutas coletadas na Nigéria (Olawore et al., 2005).

No Brasil, ambos os terpenos β -cariofileno e α -zingibereno foram os principais constituintes do OE de folhas de *M. paniculata* coletadas no estado do Espírito Santo (Neta et al., 2017). A composição química do OE das folhas de *M. paniculata* coletadas no estado de Goiás foi semelhante à relatada por Neta et al. (2017), mas difere em relação ao β -cubebeno (10,2%), que foi identificado como o terceiro maior componente do OE das folhas, embora não tenha sido encontrado no óleo extraído no Espírito Santo.

5.2.1 Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas, frutos maduros e verdes de *M. Paniculata*.

A atividade de eliminação de DPPH é usualmente apresentada por um valor de EC₅₀, definido como a concentração do antioxidante necessária para eliminar 50% do DPPH presente na solução de teste. Acredita-se que, o efeito de antioxidantes na eliminação de radicais DPPH seja pela sua capacidade de doação de hidrogênio ou atividade de remoção de radicais livres. A presença de antioxidantes em uma amostra, leva ao desaparecimento dos cromogênicos do radical DPPH, que podem ser detectados espectrofotometricamente a 515 nm. De forma que, um valor mais baixo de EC₅₀ indica maior atividade antioxidante (Medini et al., 2011).

O ensaio de verificação do sequestro do radical livre DPPH exibiu valores de $EC_{50} = 932.55 \mu\text{g/mL}$, $1123.72 \mu\text{g/mL}$ e $716.72 \mu\text{g/mL}$ para OE das folhas, frutos maduros e verdes de *M. paniculata*, respectivamente. Comparando-se o valor de EC_{50} obtido para os OEs em estudo com o padrão BHT ($EC_{50} = 85,20 \mu\text{g/mL}$). A partir dos resultados obtidos, comprova-se o baixo potencial antioxidante destes óleos. Estes dados demonstraram que o potencial antioxidante do OE das folhas de *M. paniculata* ocorrente no Brasil é diferente do potencial do OE das folhas de *M. paniculata* encontrada nas montanhas de Cuba (Rodríguez et al., 2012). Essa diferença observada no potencial antioxidante do OE de uma mesma parte da planta e de uma mesma espécie pode ser justificada com base nas diferenças de composição química. As variações nas concentrações dos constituintes químicos de OE podem ser justificadas levando-se em consideração vários fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, estágio de desenvolvimento e idade, temperatura, horário de coleta, disponibilidade de água, radiação UV, os nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e dano tecidual, já que todos atuam no metabolismo secundário, influenciando na quantidade total de metabólitos produzidos e também em suas proporções relativas (Andrade et al., 2013). A atividade antioxidante dos OE dos frutos verdes e maduros está sendo investigada pela primeira vez neste trabalho.

O potencial antioxidante de OE é amplamente investigado por pesquisadores do mundo inteiro (Morshedloo et al., 2017), e a baixa atividade antioxidante demonstrada pelos óleos essenciais de *M. paniculata* pode ser explicada pela baixa concentração de compostos com este potencial. O mesmo não possui em sua composição compostos com reconhecida atividade antioxidante em quantidades significativas, exceto a presença de *trans*- β -cariofileno que associado com compostos fenólicos têm seu potencial antioxidante aumentado através do efeito sinérgico (Shahidi et al., 1992).

5.2.2 Atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas, frutos maduros e verdes *M. paniculata*.

Na busca por novos agentes leishmanicidas, foi avaliado em culturas de promastigota de *Leishmania amazonensis* o efeito dos óleos essenciais extraídos das folhas, frutos verdes e maduros de *M. paniculata* (Rutaceae).

O potencial leishmanicida dos OEs tem sido bem estudado (Cardoso et al. 2015), e o OE de folhas de *M. paniculata* apresentou alta atividade leishmanicida quando

testado contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. O aumento da lise parasitária foi observado com o aumento da concentração de OE, com $IC_{50} = 7.33 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Os OE dos frutos (Verdes e Maduros), apesar de terem exibido valores de IC_{50} maior, ainda assim foram ativos contra o parasita. O óleo dos frutos (Maduros e Verdes) apresentaram valores de $IC_{50} = 13.04 \pm 1.64$ e $30.77 \pm 2.07 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2) Os OEs de *M. paniculata* inibiram o crescimento do parasita de maneira dose dependente da concentração. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B ($IC_{50} = 0,011 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$).

Em relação à atividade leishmanicida (valores IC_{50}), a literatura descreve que amostras com $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ são consideradas altamente ativas, ($IC_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$) ativas, ($IC_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$) moderadamente ativas e inativas (Andrade et al. 2018). Segundo Kauffmann et al. (2017), a atividade leishmanicida observada provavelmente pode ser atribuída à mistura de constituintes sesquiterpênicos. A promissora atividade leishmanicida exibida pelos OEs de folhas de *M. paniculata* e frutos maduros pode ser atribuída à presença do constituinte químico *trans*- β -cariofileno, que foi identificado em alta concentração nos óleos estudados.

O óleo essencial dos frutos verdes, embora ativo, apresentou o maior valor de IC_{50} , fato que pode ser explicado pela baixa concentração de *trans*- β -cariofileno no óleo. O sesquiterpeno *trans*- β -cariofileno é uma nota de menção por já ter sua promissora atividade leishmanicida relatada na literatura (Soares et al., 2013).

Estudos em culturas de promastigotas de *L. amazonensis* também revelaram que o sesquiterpeno oxigenado nerolidol, que apesar de estar em menor concentração no OE das folhas, possui atividade leishmanicida, que pode estar associada à inibição da biossíntese de isoprenoides celulares (Arruda et al., 2005). Isso encoraja uma investigação intensiva dos mecanismos de ação dos OE de terpenos. Também foi sugerida que a baixa densidade dos OEs contribuiu para o rompimento da membrana citoplasmática, a força motriz dos prótons, o fluxo de elétrons, o transporte ativo e também a coagulação do conteúdo celular (Dhifi et al., 2016). Assim, a busca por novas opções de tratamento para essa doença negligenciada é fundamental e os óleos essenciais ou terpenos são uma alternativa. No entanto, mais estudos são necessários para explicar os mecanismos completos dessas interações, particularmente no caso específico da leishmaniose.

5.3. Materiais e Métodos

5.3.1 Material Vegetal

O material vegetal foi coletado no Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, em Rio Verde, Estado de Goiás, Brasil, em outubro de 2017, às 9h. A planta foi identificada pela botânica Erika Amaral e uma amostra foi depositada em o Herbário Jataiense Professor Germano Guarim Neto no número exsicata HJ 28760/MP.

5.3.2 Extração do Óleo Essencial

Os OEs de *M. paniculata* foram extraídos de folhas e frutos (Verdes e Maduros) por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 2 horas. A hidrodestilação foi realizada em triplicado. O material vegetal foi dividido em três amostras de 500 g cada, e 500 mL de água destilada foram adicionados a cada amostra. Após a coleta manual dos OEs, traços de água remanescentes no óleo foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguido de filtração. Os OEs foram armazenados em frasco âmbar e mantidos em geladeira a 4°C até a análise. O rendimento de OE foi calculado a partir do peso das folhas frescas, frutos verdes e maduros e expressos como a média das análises em triplicado.

5.3.3 Análise dos Óleos Essenciais

Os OEs foram dissolvidos em éter etílico e analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) usando os sistemas Shimadzu QP5000 Plus e GCMS2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A temperatura da coluna no CG-DIC foi programada para aumentar de 60 a 240°C a 3°C/min e foi mantida a 240°C durante 5 min; o gás transportador foi H₂ a um caudal de 1,0 mL/min. O equipamento foi ajustado para operar no modo de injeção; o volume de injeção foi de 0,1 µl (razão de divisão de 1:10), e as temperaturas do injetor e do detector foram de 240 e 280°C, respectivamente.

As concentrações relativas dos componentes foram obtidas através da normalização das áreas dos picos (%). As áreas relativas consistiram na média de análises tri-compostas de CG-DIC. As condições de CG-MS e a identificação dos óleos essenciais foram relatadas anteriormente (Melo et al., 2015). A identificação dos componentes voláteis dos óleos essenciais de *M. paniculata* (Tabela 1) baseou-se em

seus índices de retenção em uma coluna capilar Rtx-5MS (30 mx 0,25 mm; 0,250 µm) sob as mesmas condições operacionais usadas para GC em relação a série homóloga de n-alcenos (C₈-C₂₀).

As estruturas foram computadorizadas com Wiley 7, NIST 08 e FFNSC 1.2, e seus padrões de fragmentação foram comparados com dados da literatura (Adams, 2007).

5.3.4 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada segundo método descrito por Oliveira et al., (2016). A atividade antioxidante foi avaliada pelo método da capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH). Foram preparadas soluções etanólicas de 0,5 a 10 g.L⁻¹ de DPPH para todo o ensaio. As leituras das absorbâncias foram realizadas após 60 minutos da adição de 0,1 mL da solução de óleo essencial em diferentes concentrações e 3,9 mL da solução de DPPH (0,06 mM) em espectrofotômetro digital de UV-Vis marca Bel Engineering modelo UV-M51 no comprimento de onda de 515 nm, em cubeta de quartzo. Os resultados foram expressos em EC₅₀ µg/mL (quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH).

5.3.5 Atividade leishmanicida

Para avaliar a atividade leishmanicida, as formas promastigota de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Posteriormente, a cerca de 1 x 10⁶ parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços, e os óleos essenciais previamente dissolvidos em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO, solução estoque 100 mM) (Synth) foram adicionados em concentrações de 3,12 a 50 µg/mL às culturas. A anfotericina B (Sigma Aldrich, 97% de pureza) variou de 0,19 a 0,011 µg/mL em média e as diferenças foram positivas.

As temperaturas foram incubadas em incubadora BOD (Quimis) a 25°C por 24h, e a atividade leishmanicida foi inibida pelo crescimento das formas promastigota inibida, conforme revelado pela contagem de peso total de projestigota vivos na Câmara Neubauer (Porto Alegre, BR), com base na motilidade flagelar. Utilizou-se meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1% de DMSO (Synth) (concentração maior). Os resultados

foram expressos como média de peso de inibição do humor em relação ao controle negativo (0,1% DMSO). Como pesquisas foram depois em triplicado.

5.4 Conclusão

Com base nos achados obtidos, pode-se concluir que alguns componentes importantes nos óleos de *M. paniculata* são α -zingibereno, germacreno D, α -copaeno, β -cubebeno, α -ilangeno, sesquiterpeno e *trans*- β -cariofileno.

A promissora atividade leishmanicida dos óleos investigados pode estar relacionada à presença e com a alta concentração do constituinte *trans*- β -cariofileno. Neste sentido, os óleos essenciais de *M. paniculata* podem ser considerados fonte de compostos bioativos com potencial leishmanicida.

Vale ressaltar que os óleos essenciais de *M. paniculata* apresentaram baixa atividade antioxidante quando avaliados pelo método DPPH. É muito difícil atribuir às atividades a um ou a alguns princípios ativos nesses óleos, porque os compostos menores também podem ser eficazes em relação a esses potenciais. Sabe-se que, muitos compostos que estão presentes em pequenas quantidades numa mistura podem atuar como elementos sinérgicos ou isoladamente. Em suma, mais estudos são necessários para identificar os constituintes químicos ativos de óleos essenciais de *M. paniculata* e determinar CIM *in vivo* e *in situ*.

5.5 Referências Bibliográficas

- Adams RP. 2007. In Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 469 p.
- Andrade MA, Cardoso MG, Andrade J, Silva LF, Teixeira ML, Resende JMV, Figueiredo ACS, Barroso JG (2013) Chemical composition and antioxidante activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. Antioxidants 2, 384-397.
- Andrade MA, Azevedo CS, Motta FN, Santos ML, Silva CL, Santana JM, Bastos IMD (2016) Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. Evid.Based Complement.Alternat.Med. 16, 444.
- Andrade PM, Melo DC, Alcoba AET, Júnior WGF, Pagotti MC, Magalhães LG, Santos TCL, Crotti AEM, Alves CCF, Miranda MLD (2018) Chemical composition and

- evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.). An. Acad. Bras. Cienc.
- Arruda DC, D'Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SRB (2005) Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(5), 1679-1687.
- Blanco VR, Nascimento-Júnior NM (2017) Leishmaniose: aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. *Rev. Virtual Quim.* 9(3), 861-876.
- Cardoso BM, Mello TFP, Lopes SN, Demarchi IG, Lera DSL, Pedroso RB, Cortez DA, Gazim ZC, Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC (2015) Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110(8), 1024-1034.
- Chirag JP, Tyagi S, Halligudi N, Yadav J, Pathak S, Singh SP, Pandey A, Kamboj DS, Shankar P (2013) Antioxidant activity of herbal plants: a recent review. *J. Drug Discov. Therap.* 1(8), 01-08.
- Chowdhury JU, Bhuiyan MNI, Yusuf M (2008) Chemical composition of the leaf essential oil of *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Blangladesh J Pharmacol.* 3, 59-63.
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W (2016) Essential oils' chemical compositions and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines* 3, 25.
- Dosoky NS, Satyal P, Gautam TP, Setzer WN (2016) Composition and biological activities of *Murraya paniculata* (L.) Jack. Essential oil from Nepal. *Medicines* 3, 1-10.
- Kauffmann C, Ethur EM, Arossi K, Hoehne L, Freitas EM, Machado GMC, Cavalheiro MMC, Flach A, Costa LAMA, Gnoatto SCB (2017) Chemical composition and evaluation preliminar of antileishmanial activity *in vitro* of essential oil from leaves of *Eugenia pitanga*, a native species of Southern of Brazil. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 20(2), 559-569.
- Medini H, Elaissi A, Khouja ML, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Marongiu B, Chemli R (2011) Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. berries. *Nat. Prod. Res.* 25(18), 1695-1706.
- Melo NI, Carvalho CE, Fracarolli L, Cunha WR, Veneziani RCS, Martins CHG, Crotti AEM (2015) Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd.(Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 46, 519-525.

- Meena H, Pandey HK, Pandey P, Arya MC, Ahmed Z (2012) Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants *Baccopa monnieri* and *Centella asiatica*. *Ind. J. Pharmacol.* 44(1), 114-117.
- Morais SM, Júnior FEAC, Silva ARA, Neto JSM, Rondina D, Cardoso JHL (2006) Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Quim Nova* 29(5), 907-910.
- Mesquita SG, Martinez MF, Romoff P, Fávero AO, Lieber SR, Lago JHG (2008) Constituintes químicos das folhas de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Braz. J. Pharmacogn.* 18(4), 563-568.
- Morshedloo MR, Mumivand H, Craker LE, Maggi F (2017) Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. *gracile* at different phenological stages and plant parts. *J. Food Process. Preserv.* 2017, e13516.
- Neta MCS, Vittorazzi C, Guimarães AC, Martins JDL, Fronza M, Endringer DC, Scherer R (2017) Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharm. Biol.* 55(1), 190-197.
- Olawore NO, Ogunwande IA, Ekundayo O, Adeleke KA (2005) Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). *Flavour Fragr J.* 20, 54-56.
- Oliveira JD, Alves CCF, Miranda MLD, Martins CHG, Silva TS, Ambrosio MALV, Alves JM, Silva JP (2016) Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. *Rev. Bras. Pl. Med.* 18(2), 502-510.
- Rodríguez EJ, Ramis-Ramos G, Heyden YV, Simó-Alfonso EF, Lerma-García MJ, Saucedo-Hernández Y, Monteagudo U, Morales Y, Holgado B, Herrero-Martínez JM (2012) Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of central Cuba. *Nat Prod Commun.* 7(11), 1527-1530.
- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32(1), 67-103.
- Soares DC, Portella NA, Ramos MFS, Siani AC, Saraiva EM (2013) *Trans*- β -caryophyllene: na effective antileishmanial compound found in comercial copaíba oil (*Copaifera* spp.). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 761323.

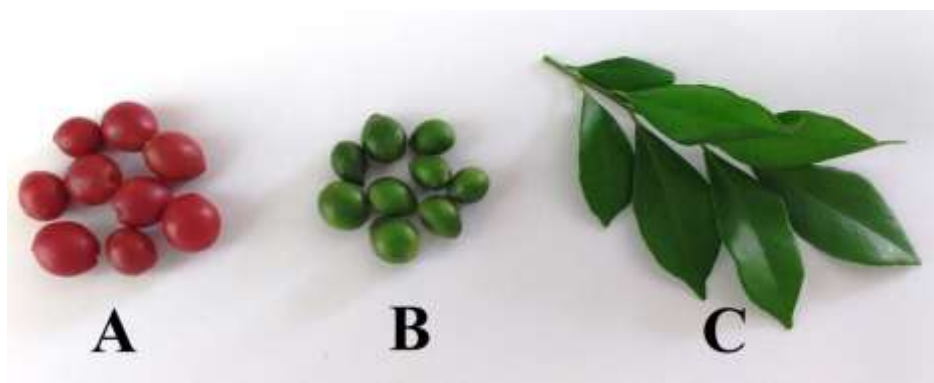


Fig 1. *M. paniculata* (Rutaceae): Frutos maduros (A), Ffrutos verdes (B) e Folhas (C).

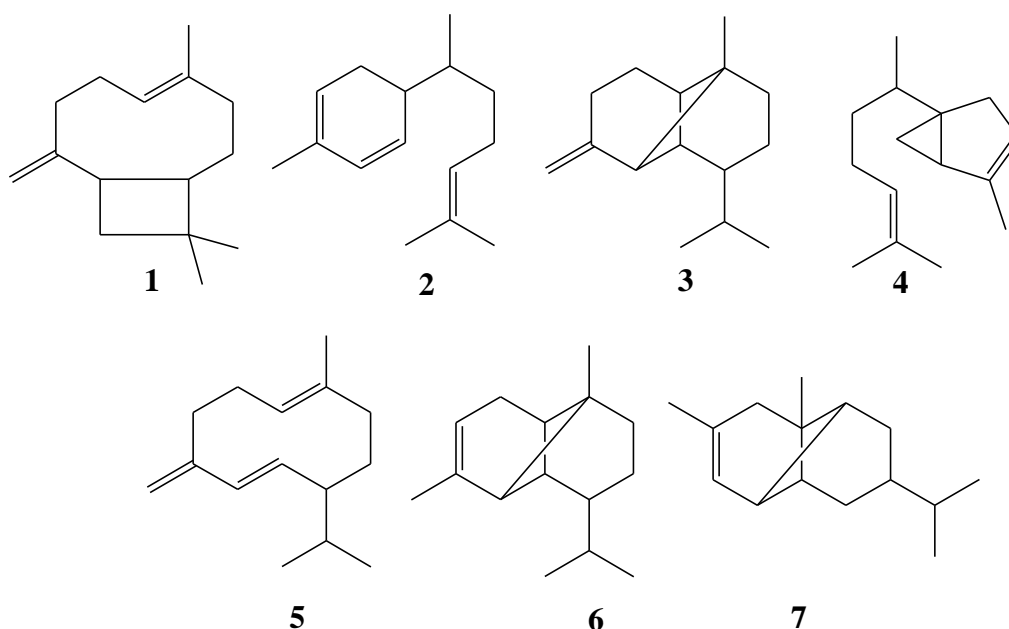


Fig 2. Estruturas dos principais constituintes presentes nos óleos essenciais das folhas e dos frutos (Verdes e Maduros) de *M. paniculata*: *trans*- β -cariofileno (1); α -zingibereno (2); β -cubebeno (3); sesquiterpeno (4); germacreno D (5); α -copaeno (6) e α -ylangeno (7).

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de frutos maduros (OE-FM), frutos verdes (OE-FV) e folhas (OE-FM) de *M. paniculata*.

Compostos	RI _{exp}	RI _{lit}	%		
			RA		
			OE-FM	OE-FV	OE-FM
Bicicloelemeno	1334	1336	0.3	1.4	-

Isômero elemeno	1341	1344	2.7	-	-
α -Cubebeno	1351	1352	0.9	6.1	-
β -Bourboneno	1377	1384	-	-	0.6
α -Copaeno	1379	1377	6.1	12.7	1.6
β -Cubebeno	1385	1390	-	-	10.2
α -Ylangene	1405	1406	13.3	1.1	5.6
Sesquithujeno	1415	1417	0.4	25.0	-
α -Gurjuneno	1419	1419	0.1	-	-
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1425	1423	21.3	1.1	23.8
Isogermacreno D	1437	1439	0.8	-	-
β -Gurjuneno	1439	1440	0.7	-	-
β -Humuleno	1446	1440	-	-	6.4
γ -Muuroleno	1448	1449	0.4	6.4	-
α -Humuleno	1456	1455	5.3	1.0	-
Aromadendreno	1465	1463	1.1	-	1.8
Germacreno D	1480	1480	10.9	13.1	9.8
α -Zingiberen	1499	1496	9.7	18.2	21.0
Bicyclogermacreno	1503	1501	5.3	0.5	-
β -Bisaboleno	1508	1506	0.8	1.7	1.2
β -Cadineno	1528	1527	5.5	5.6	-
Cadina-1.4-dieno	1534	1533	0.3	-	-
<i>trans</i> -Nerolidol	1557	1565	-	-	1.4
Germacreno-D-4-ol	1574	1574	1.0	1.0	-
Spathulenol	1576	1576	-	-	2.5
Oxido cariofileno	1590	1589	1.2	1.1	1.5
Acetato de laurilo	1608	1606	0.2	-	-
2-metilbutaato de octil	1624	1623	0.2	-	-
t-Cadinol	1634	1638	-	-	0.4
10-epi- α -Muurolol	1640	1641	-	-	2.6
Ácido isovalérico.éster decílico	1657	1659	0.1	-	-
τ -Muurolol	1659	1660	0.5	-	-
α -Cadinol	1662	1663	0.3	-	1.0
Senicianato de decilo	1720	1719	4.0	-	-
Ácido isovalérico.éster dodecílico	1844	1845	2.5	-	-
Total identificado			95.9	96.1	97.7

RI_{exp}: RI_{exp}: Índice de retenção determinado em relação aos n-alcanos (C₈ – C₂₀) na coluna Rtx-5MS. RI_{lit}: Índice de Retenção da Literatura.

Tabela 2. Atividade leishmanicida dos óleos essenciais de frutos maduros (OE-FM), frutos verdes (OE-FV) e folhas (LM-EO) de *M. paniculata* contra formas promastigota de *L. amazonensis*.

	% De lise± S.D /Concentração (µg.mL ⁻¹)					IC ₅₀ (µg/mL)
	50	25	12.5	6.25	3.12	
OE-FM	100±0.00	98.28±1.01	72.87±22.16	39.10±2.03	19.22±14.74	7.33±2.07
OE-FM	100±0.00	74.55±4.06	40.25±21.63	25.24±34.68	17.49±16.70	13.04±1.64
OE-FV	78.87±29.8	31.56±8.73	17.21±7.54	12.39±3.54	2.88±4.08	30.77±2.07
	0.19	0.095	0.047	0.023	0.011	
Amph.B	99.88±0.60	78.33±24.43	68.74±21.97	54.67±17.77	42.44±20.97	0.011±0.34

Negative Control:Meio RPMI + 0.1% DMSO. **Amph. B:** Amtotericina B; **S.D:** Desvio padrão.

6. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- Os compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas e frutos (Verdes e Maduros) de *Murraya paniculata* (L.) Jack, apresentam predominância de sesquiterpenos: β -cariofileno, α -Ylangeno, germacreno-D e α -zingibereno
- Os OEs dos frutos (Verdes e Maduros) apresentaram moderada atividade anticariogênica contra as bactérias *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *S. salivarius*.
- O óleo essencial de *M. paniculata* dos frutos (Verdes e Maduros) exibiu atividade antimicobacteriana com os valores de CIM respectivamente, ativos diante de *Mycobacterium kansasii* (CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$), moderadamente ativos diante de *M. tuberculosis* (CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$) e inativos contra *M. avium* (CIM = 2000 $\mu\text{g/mL}$).
- Foi verificada uma atividade antifúngica promissora diante de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. De modo que, o ML-EO na dose de 300 μL exibiu 91,2% de inibição sobre crescimento micelial do fungo.
- Não houve atividade significativa em relação às atividades antioxidantes uma vez que os valores de EC_{50} dos OEs das folhas e frutos (Verdes e Maduros) foram superiores a 700 $\mu\text{g/mL}$.
- Em relação a atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* os OEs das folhas e frutos (Verdes e Maduros), apresentaram promissora atividade. Sendo que, o óleo das folhas foi altamente ativo ($\text{IC}_{50} = 7,33 \pm 2,07$ $\mu\text{g/mL}$) enquanto óleos dos frutos (verdes e maduros) foram ativos, com valores de $\text{IC}_{50} = 30,77 \pm 2,07$ $\mu\text{g/mL}$ e $13,04 \pm 1,64$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.