



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS  
FOLHAS DE *Cinnamomum triplinerve*  
(Lauraceae)**

Acadêmica: Michela Silva Holsbach Nakazato



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS  
FOLHAS DE *Cinnamomum triplinerve*  
(Lauraceae)**

Acadêmica: Michela Silva Holsbach Nakazato

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Euclésio Simionatto

Co-orientador: Ademir dos Anjos

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais.

N154c Nakazato, Michela Silva Holsbach

Composição química e atividade biológica do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum triplinerve* (Lauraceae)/ Michela Silva Holsbach Nakazato. – Dourados, MS: UEMS, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Euclésio Simionatto.

1. Óleos voláteis 2. Canela fedorenta 3. Citotóxico I. Título

CDD 23. ed. - 633.83

**MICHELA SILVA HOLSBACH NAKAZATO**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA  
DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE  
*Cinnamomum triplinerve* (LAURACEAE)**

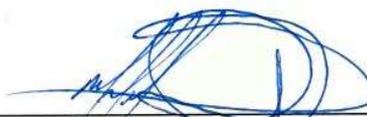
Este exemplar compreende a redação final da dissertação de mestrado defendida por Michela Silva Holsbach Nakazato.

Dourados/MS, 16 de dezembro de 2016.

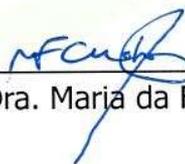
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Euclésio Simionatto – Presidente



Prof. Dr. Rogério Cesar de Lara da Silva



Profa. Dra. Maria da Fátima Cepa Matos



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Unidade Universitária de Dourados  
Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

## EPÍGRAFE

“O vento é o mesmo:  
Mas sua resposta é diferente, em cada folha.  
Somente a árvore seca fica imóvel,  
Entre borboletas e pássaros”

Cecília Meireles



Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

---

## DEDICATÓRIA

A Deus e sua corte pelo seu Amor sempre presente e visível das mais diversas formas.

“Com muito custo, podemos conhecer o que está  
na terra e com dificuldade encontramos o que está  
ao alcance da mão. Mas quem poderá investigar o  
que está no céu?” (Sabedoria, 9)

À minha família por sua confiança, apoio e incentivo incondicionais.

“Filho meu, ouve a instrução de teu pai,  
e não deixes o ensino de tua mãe.  
Porque eles serão uma grinalda de graça  
para a tua cabeça, e colares para o teu  
pescoço.”(Provérbios, 1; 8-9)



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pela infinita bondade e bênçãos derramadas sobre a minha vida a cada amanhecer, me capacitando a cada dia com a sabedoria.*

*Aos meus pais João Mateus e Maria de Fátima e meus irmãos Helder Mateus e Felipe Mateus, sempre torcendo pelas minhas conquistas e por todo carinho que mesmo distante conseguiram transmitir.*

*Ao meu esposo Airton Nakazato pela amizade, companheirismo sempre ao meu lado, acreditando e trazendo conforto ao meu coração nos momentos de angústia e ansiedade.*

*Aos meus filhos primeiramente um pedido de desculpa pelos momentos que tive que me ausentar, mesmo estando presente.*

*Ao Thales Yudi, um fofo, que encheu meus dias de alegria e de orgulho fazendo desses dois anos a maior recompensa ao voltar para casa.*

*À Thaís Yukari, agradecer é pouco, minha melhor amiga, minha confidente... obrigada por ouvir incansavelmente minhas apresentações, desde os seminários... Essa conquista é nossa minha linda!!*

*Ao orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Euclésio Simionatto, obrigada pela troca de experiência, e conhecimento compartilhado.*

*Ao co-orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Ademir dos Anjos por toda colaboração, contribuição e incentivo bem como o compartilhamento do material biológico.*

*Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Rogério César Lara da Silva, primeiro como coordenador, e por aceitar fazer parte da minha banca e pela troca de experiência.*

*À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Manfroi Fuzzinato pelas contribuições com a metodologia científica, mas principalmente pela amizade e apoio sempre que precisei.*

*À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Manfroi pela amizade e incentivo, principalmente pelos momentos agradáveis de descontração extra.*

*À Cintia Hisano minha amiga que chegou de mansinho, e compartilhou da minha ansiedade, e das minhas angústias, e das minhas alegrias nesse período tão almejado.*

*À Elisandra que sempre esteve presente, seja me incentivando ou trocando experiência.*

*À Alice, Michelle, Leandro, Janaína, Andresa, Lucas pelas horas de estrada que compartilhamos juntos e pelas ansiedades com os seminários e provas.*

*Aos amigos Odete Resende, Robinson Alt e Lísida Alt que mesmo distantes se fizeram presentes.*

*Aos amigos e colegas de trabalho, técnicos e professores da UEMS que sempre presente não criaram barreiras para que eu conquistasse essa vitória: Inês Barba, André Molina, Élide Galvão, Rose Volpato, Neide Olsen, Eliana Martins, Celina Comim, Alberto Cavalheiro, Sílvia Benedetti, Elisângela Serenato, Priscila Morato, Fabíola Akita.*



## COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Cinnamomum triplinerve* (Lauraceae)

### RESUMO

Os óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de partes do material vegetal que por sua vez possuem compostos terpênicos que fazem parte do metabolismo secundário das mesmas e apresentam propriedades biológicas, entre elas atividade antibacteriana e antineoplásica, contemplando portanto, como objetivo desta pesquisa analisar a composição química e associá-la à atividade biológica do óleo das folhas da espécie *Cinnamomum triplinerve*, pertencente a família Lauraceae. O óleo essencial das folhas *in natura* da espécie *Cinnamomum triplinerve*, foram obtidos por hidrodestilação por arraste de vapor, em sistema Clevenger, com rendimento de 0,37%, sendo que a mesma apresentou como compostos majoritários os sesquiterpenos cariofileno e nerolidol, enquanto que a extração com folhas secas apresentou rendimento de 0,16%, e obteve em sua composição química o sesquiterpeno espatulenol, como componente majoritário. Para essas análises químicas foram utilizadas técnicas cromatográficas. No ensaio biológico antibacteriano, utilizou-se linhagens de 7 microrganismos sendo esses: as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. As propriedades antimicrobianas do óleo essencial puro foram determinadas por triagem utilizando métodos de bioautografia direta, difusão em ágar e microdiluição em placas de 96 poços, tanto para folhas *in natura* quanto para o óleo essencial de folhas secas, apresentando uma ação antibacteriana mais eficiente para folhas secas. Foi realizado também atividade citotóxica com 9 linhagens tumoral humanas, e 1 linhagem celular normal onde o óleo essencial de folhas *in natura* apresentou atividade para as seguintes linhagens testadas: U251 (glioma); 786-0 (rim); PC-3 (próstata); K562 (leucemia) dentre as quais, apresentou resultado inativo para as demais linhagens testadas. Para o óleo essencial de folhas secas da *Cinnamomum triplinerve* embora apresentando fraca atividade para células Ovcar 03, obteve-se um índice de seletividade de 3,6 vezes mais citotóxico para células de ovário do que para células normais HaCat. A amostra não apresentou citotoxicidade para as demais linhagens analisadas.

**Palavras-chave:** óleos voláteis; canela fedorenta; citotóxico.



**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF THE LEAVES OF *Cinnamomum triplinerve* (Lauraceae)**

**ABSTRAT**

The essential oils are aromatic liquids extracted from parts of the plant material that in turn have terpene compounds that are part of the secondary metabolism of the same and have biological properties, among them antibacterial and antineoplastic activity, contemplating, therefore, as objective of this research to analyze the chemical composition And to associate it with the biological activity of the oil of the leaves of the species *Cinnamomum triplinerve*, belonging to the family Lauraceae. The essential oil of the in natura leaves of the species *Cinnamomum triplinerve*, were obtained by hydrodistillation by steam drag, in Clevenger system, with yield of 0.37%, being that the same one presented displayed the major compounds the sesquiterpenos cariofileno and nerolidol, whereas the Extraction with dry leaves presented yield of 0.16%, and obtained in its chemical composition the sesquiterpeno espatulenol, as major component. Chromatographic techniques were used for these chemical analyzes. In the antibacterial biological assay, we used lines of 7 microorganisms: gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* and gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. The antimicrobial properties of the pure essential oil were determined by screening using direct bioautography, agar diffusion and microdilution methods in 96-well plates for both in natura leaves and essential oil of dried leaves, demonstrating a more efficient antibacterial action for leaves Dried. Cytotoxic activity was also performed with 9 human tumor lines and 1 normal cell line where the essential oil of leaves in natura presented activity for the following tested strains: U251 (glioma); 786-0 (kidney); PC-3 (prostate); K562 (leukemia) among which, presented inactive result for the other tested strains. For *Cinnamomum triplinerve* dry leaf essential oil although showing weak activity for Ovcar 03 cells, a selectivity index of 3.6 fold more cytotoxic for ovary cells was obtained than for normal HaCat cells. The sample did not present cytotoxicity to the other strains analyzed.

**Keywords:** volatile oils; Stinking cinnamon; cytotoxic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa geográfico do Gênero <i>Cinnamomum</i> .....	25
Figura 2. Árvore da espécie <i>Cinnamomum triplinerve</i> .....	27
Figura 3. Diferenças nas estruturas de bactérias gram-positivas e gram-negativas .....	32
Figura 4. Representação gráfica dada pela curva de concentração sérica-tempo sob o efeito do antimicrobiano no organismo. ....	34
Figura 5. Coordenadas Geográficas do ponto de coleta no Município de Mundo Novo-MS .....	39
Figura 6. Extração do óleo essencial por hidrodestilação das A) folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . B) folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> .....	42
Figura 7. Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	53
Figura 8. Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial de folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	54
Figura 9. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> , obtido por CG-EM. ....	55
Figura 10. Espectros comparativos entre a amostra do composto monoterpeneo, $\alpha$ -pineno, presente no óleo de folhas <i>in natura</i> (A) e o espectro da literatura NIST (B)...	56
Figura 11. Espectros comparativos entre a amostra do composto monoterpeneo, $\beta$ -pineno, presente no óleo de folhas <i>in natura</i> (A) e o espectro da literatura NIST (B)...	56
Figura 12. Espectros comparativos entre a amostra do composto sesquiterpeneo, cariofileno, presente no óleo de folhas <i>in natura</i> (A) e o espectro da literatura NIST (B). ....	57
Figura 13. Espectros comparativos entre a amostra do composto sesquiterpeneo, nerolidol, presente no óleo de folhas <i>in natura</i> (A) e o espectro da literatura NIST (B). ....	57
Figura 14. Estrutura dos principais compostos identificados no óleo de folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	58
Figura 15. Isômeros do nerolidol.....	59

Figura 16. Cromatograma representando os compostos $\tau$ -cadineno 2,06% com tempo de retenção 32,78 e o $\gamma$ -cadineno 3,58% com tempo de retenção 33,00.....	60
Figura 17. Espectros comparativos entre a amostra do composto $\tau$ -cadineno presentes no óleo de folhas <i>in natura</i> (A) e o espectro da literatura NIST. ....	60
Figura 18. Espectros comparativos entre a amostra do composto $\gamma$ -cadineno presentes no óleo de folhas <i>in natura</i> (A) e o espectro da literatura NIST. ....	61
Figura 19. Estruturas dos sesquiterpenos $\tau$ -cadineno 2,06% e $\gamma$ -cadineno 3,58%.....	62
Figura 20. Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> obtido por CG-EM.....	63
Figura 21. Espectros comparativos entre a amostra do óleo essencial das folhas secas (A) e o banco de dados da Literatura NIST (B), referente ao composto sesquiterpeno oxigenado espatulenol. ....	64
Figura 22. Estrutura do principal compostos identificado no óleo de folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> com abundância de 83,73%.....	64
Figura 23. Resultados de bioautografia direta com formação de halos de inibição. A) <i>Enterococcus faecalis</i> ; B) <i>Staphylococcus aureus</i> ; C ) <i>Enterobacter aerogenes</i> . ....	65
Figura 24. Halo de inibição na concentração 5 $\mu$ L A) <i>Enterococcus faecalis</i> B) <i>Pseudomonas fluorescens</i> C) <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	67
Figura 25. Halo de inibição pelo método de difusão em ágar em concentração de 5 $\mu$ L A) <i>Staphylococcus aureus</i> B) <i>Enterococcus faecalis</i> C) <i>Pseudomonas fluorescens</i> D) <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	68
Figura 26. Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> pelo método de Microdiluição em placas de 96 poços A – <i>Staphylococcus aureus</i> e B - <i>Enterococcus faecalis</i> . ....	70
Figura 27. Concentração Bactericida Mínima frente à <i>Staphylococcus aureus</i> e a <i>Enterococcus faecalis</i> de folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	71
Figura 28. Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> pelo método de Microdiluição em placas de 96 poços. Da esquerda para	



direita <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , e <i>Sthaphylococcus aureus</i> . .....	72
Figura 29. Concentração Bactericida Mínima frente à <i>Staphylococcus aureus</i> e a <i>Enterococcus faecalis</i> de folhas secas. ....	73



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do rendimento dos óleos essenciais de espécies de Lauraceae..	52
Tabela 2. Relação dos compostos identificados a partir de análise cromatográfica do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> obtido por CG-EM. ....	58
Tabela 3. Lista dos compostos obtidos a partir de análise cromatográfica do óleo essencial de folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> obtido por CG-EM. ....	63
Tabela 4. Atividade antibacteriana do óleo essencial da folha <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> através de difusão em ágar (halo de inibição mm).....	66
Tabela 5. Resultado de atividade antibacteriana do óleo essencial da folha seca de <i>Cinnamomum triplinerve</i> através de difusão em ágar (halo de inibição mm).....	68
Tabela 6. Resultados de atividade antibacteriana (MIC) do óleo essencial das folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	70
Tabela 7. Atividade antibacteriana (CIM) do óleo essencial das folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	72
Tabela 8. TGI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) – Resultados de atividade antineoplásica e citotóxica do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	75
Tabela 9. TGI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) – Resultados de atividade antineoplásica e citotóxica do óleo essencial de folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . ....	76



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Cepas bacterianas empregadas nos bioensaios. CCBH- Coleção de Cultura Bacteriana de Origem Hospitalar, doadas pela Fundação Fiocruz; CCCD Coleção de Cultura Cepar Diagnóstica (comercial). ....	40
Quadro 2. Disco antimicrobiano comercial utilizado na técnica de disco de difusão em ágar .....	40
Quadro 3. Reagentes utilizados para a triagem antibacteriana .....	41
Quadro 4. Materiais utilizados para a triagem antibacteriana .....	41
Quadro 5. Equipamentos utilizados nas análises .....	41



## ABREVIATURAS E SIGLAS

**C:** Carbono

**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada

**CCBS:** Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

**CG:** Cromatografia Gasosa

**CIM:** Concentração Inibitória Mínima

**CBM:** Concentração Bactericida Mínima

**cm<sup>-1</sup>:** Centímetros<sup>-1</sup>

**DIC:** Detector de Ionização em Chama

**EM:** Espectrômetro de Massas

**g:** Gramas

**H:** Hidrogênio

**He:** Hélio

**IS:** Índice de seletividade

**IKc:** Índice de retenção calculado

**LPCS:** Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde

**µg:** Microgramas

**mg:** Miligramas

**PGRN:** Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**mL:** Mililitros

**NCI:** Instituto Nacional do Câncer

**NIST:** National Institute of Standard Technology

**nm:** Nanômetros

**OE:** Óleos Essenciais

**SRB:** Sulforrodamina B

**TR:** Tempo de Retenção

**TGI:** (*total growth inhibition*) Inibição citostático total

**UFC:** Unidade Formadora de Colônia



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos.....	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1 Óleo essencial.....	21
3.1.1 Propriedades farmacológicas dos compostos presentes em óleos essenciais .	22
3.2 Família Lauraceae.....	24
3.2.1 Gênero <i>Cinnamomum</i> .....	26
3.2.2 Espécie <i>Cinnamomum triplinerve</i> .....	26
3.2.3 Farmacobotânica da <i>Cinnamomum triplinerve</i> “canela fedorenta”.....	27
3.3 Atividade biológica.....	28
3.3.1 Atividade antibacteriana.....	28
3.3.2 Interações medicamentosas de antimicrobianos.....	33
3.4 Atividade antineoplásica e citotóxica.....	36
3.4.1 Tratamento contra neoplasias.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Material botânico.....	39
4.2 Material biológico.....	39
4.3 Reagentes.....	40
4.4 Equipamentos.....	41
4.5 Coleta e extração do óleo essencial.....	41



4.6 Análises cromatográficas .....	43
4.6.1 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) .....	43
4.6.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) .....	43
4.7 Atividade antimicrobiana .....	45
4.7.1 Bioautografia direta .....	45
4.7.2 Difusão em disco .....	45
4.7.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
4.7.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	48
4.8 Avaliação citotóxica antiproliferativa .....	48
4.8.1 Preparo das culturas celulares.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1. Rendimento dos óleos essenciais de folhas <i>in natura</i> e folhas secas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> .....	51
5.2 Identificação da composição química do óleo essencial das folhas de <i>Cinnamomum triplinerve</i> .....	52
5.2.1 Composição química do óleo das folhas <i>in natura</i> por CG-DIC.....	52
5.2.2 Composição química do óleo das folhas secas (CG-DIC).....	53
5.2.3 Composição química do óleo das folhas <i>in natura</i> por CG-EM.....	54
<b>5.2.3.1 Isômeros do sesquiterpeno nerolidol</b> .....	59
<b>5.2.3.2 Isômeros do sesquiterpeno cadineno</b> .....	60
5.2.4 Composição química do óleo das folhas secas (CG-EM).....	62
5.3 Resultados da triagem antibacterina do óleo essencial de <i>Cinnamomum triplinerve</i> . .....	64
5.3.1 Bioautografia direta do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> .....	65



5.3.2 Bioautografia direta do óleo essencial de folhas secas .....	65
5.4 Disco de difusão .....	66
5.4.1 Disco de difusão em ágar (halo de inibição) folhas <i>in natura</i> .....	66
5.4.2 Disco de difusão em ágar (halo de inibição) folhas secas .....	67
5.4.3 Atividade de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> .....	69
5.4.4 Atividade da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> .....	71
5.4.5 Atividade da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de folhas secas .....	71
5.4.6 Atividade da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de folhas secas .....	73
5.4.7 Atividades antiproliferativa e citotóxica do óleo essencial de folhas <i>in natura</i> . .....	75
5.4.8 Atividades antiproliferativa e citotóxica do óleo essencial de folhas secas....	76
6. CONCLUSÃO.....	77
7. BIBLIOGRAFIA .....	78
8. APÊNDICE .....	88
8.1 Cromatograma identificado por CG - DIC por tempo de retenção dos compostos. .....	88
8.2 Cromatograma identificado por CG - DIC por abundância dos compostos. ....	88

## 1. INTRODUÇÃO

A botânica tem sido muito utilizada, para a produção de novos fármacos em razão da vasta diversidade de espécies que apresentam características antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, entre outras, devido ao fato dos compostos sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas apresentarem estas e outras atividades. Entre as classes de produtos naturais conhecidos por suas substâncias ativas, pode-se citar, por exemplo, compostos fenólicos, alcalóides, terpenos que estão presentes em diversas famílias de espécies vegetais<sup>1</sup>.

Há muito tempo as plantas medicinais vêm sendo estudadas na tentativa de descoberta de novos princípios ativos<sup>2</sup>, sendo que as mesmas têm sido testadas no tratamento de doenças, a fim de diminuir as desvantagens trazidas pelo uso crônico de antimicrobianos sintéticos, tal como a resistência dos microrganismos aos antibióticos<sup>3</sup>.

Entre as espécies que já foram estudadas quimicamente, poucas tiveram seus extratos testados em ensaios farmacológicos, em especial para as doenças que mais atingem a humanidade atualmente, principalmente as caracterizadas pela presença de bactérias e células cancerígenas<sup>4</sup>.

As infecções bacterianas estão disseminadas pelo mundo, principalmente nos países subdesenvolvidos, e por isso os estudos sobre atividade antimicrobiana de plantas representam um grande desafio para a descoberta e identificação de novos fármacos<sup>2;5</sup>.

Por se tratar de uma planta não reportada química e biologicamente na literatura até o momento, no presente trabalho foram desenvolvidos estudos com a espécie *Cinnamomum triplinerve*, a qual é conhecida popularmente como “canela fedorenta”, coletada no município de Mundo Novo-MS. O estudo visou contribuir com as pesquisas quimiotaxonômicas e biológicas e registrar as possíveis atividades presentes no óleo essencial de suas folhas, bem como a sua composição química da espécie.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o potencial bioativo do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum triplinerve* (canela fedorenta) e correlacionar estes dados com a sua composição química.

### **2.2 Específicos**

Extrair por hidrodestilação o óleo essencial das folhas de *Cinnamomum triplinerve*;

- Avaliar o rendimento e determinar a sua composição química;
- Avaliar atividades biológicas: antibacteriana, antineoplásica e citotóxica do óleo;
- Fazer um estudo comparativo entre o óleo de folhas *in natura* e secas, de *Cinnamomum triplinerve*.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Óleo essencial**

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos aromáticos obtidos de material vegetal como flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeira, frutos e raízes<sup>6;7</sup>.

Tais óleos caracterizam-se também por se apresentarem naturalmente com uma grande variedade de constituintes que, de forma quase exclusiva, podem ser divididos em duas classes, (monoterpenos e sesquiterpenos) com base na biossíntese de origem<sup>8</sup>.

Os óleos essenciais e seus compostos têm recebido atenção especial, por se apresentarem como alternativas para novos fármacos, pois muitos desses óleos têm demonstrando ação antibacteriana, antifúngica, antimicótica, anti-helmínticos e anti-séptica, além de propriedades antioxidante, antitumoral e anti-espasmódica e também como eficazes conservante de alimentos<sup>9</sup>.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido bastante discutido devido à quantidade e variedade de compostos químicos presentes o que dificulta a atribuição de uma ação específica para a atividade antimicrobiana<sup>10</sup>.

Muitas espécies de plantas produzem substâncias ativas quando submetidas a condições de estresse, como uma reduzida disponibilidade de nutrientes no solo, pois em geral o princípio ativo está associado ao metabolismo secundário do vegetal que reflete adaptações a condições adversas ou mecanismos de defesa. Assim, a pesquisa com extratos, frações e óleos essenciais oriundos de espécies vegetais, visa uma possível aplicação dos princípios ativos no tratamento de infecções causadas por fungos, bactérias, parasitas ou vírus<sup>11</sup>.

### 3.1.1 Propriedades farmacológicas dos compostos presentes em óleos essenciais

Em 2000 Dorman & Deans, relataram que a maioria dos óleos essenciais provavelmente exercem efeito antimicrobiano, afetando a estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas<sup>12</sup>.

Dentre os compostos terpênicos estão o cariofileno, nerolidol,  $\alpha$ -pineno, e  $\beta$ -pineno<sup>13; 14</sup> sendo que, estes compostos fazem parte da composição química dos óleos essenciais das folhas de *Cinnamomum triplinerve* apresentados neste trabalho.

O  $\alpha$ -pineno possui aroma agudo e penetrante de pinho, sendo considerado também um dos principais compostos de odor ativo do óleo essencial de *Citrus sudachi*<sup>15</sup>. A esse composto também são atribuídos as seguintes descrições odoríferas: floral, erva e tipo madeira de cedro<sup>16</sup>. No que diz respeito à ação farmacológica,<sup>12</sup> estabeleceram que o  $\alpha$ -pineno era uma substância inativa como agente bactericida se comparada ao seu isômero  $\beta$ -pineno. Para chegarem a essa conclusão testaram esses compostos terpênicos *in vitro* contra 25 diferentes bactérias, sendo nove gram-positivas e dezesseis gram-negativas. Entretanto, um estudo desenvolvido em 2007 mostrou que este composto é capaz de inibir determinadas cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*) causadoras de endocardite infecciosa<sup>17</sup>. Em outro estudo mais recente<sup>18</sup>, foi demonstrado que o  $\alpha$ -pineno também possui toxicidade altamente seletiva contra três cepas de *Actinomyces madurae*. Essas bactérias são responsáveis pelo micetoma actinomicótico (lesão inflamatória subcutânea granulomatosa crônica). Essa doença infecciosa ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais<sup>19</sup>. Por último, ao  $\alpha$ -pineno atribui-se ação inseticida<sup>20</sup>.

Outro composto químico de importância em óleos essenciais é o  $\beta$ -cariofileno, que influi no aroma e possui diversas atividades biológicas onde são atribuídas diferentes propriedades farmacológicas, podendo ser empregado na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias. Várias atividades biológicas são atribuídas a esse composto tais como: anti-inflamatória, antialérgica, antifúngica e

anticarcinogênica<sup>4</sup>; atividades antimicrobianas frente à *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*<sup>21</sup>, anestésica<sup>22</sup> espasmolítica<sup>23</sup> e antiinflamatória<sup>24</sup>, ação espasmolítica, insetífuga, bactericida, antiedêmica e carcinogênica, sendo essas duas últimas, relacionadas também ao seu produto de oxidação, o óxido de  $\beta$ -cariofileno<sup>25;3; 89</sup>.

Para Peixoto *et al*<sup>26</sup>, o nerolidol é um sesquiterpeno de ocorrência natural encontrado em óleos essenciais de folhas de inúmeras variedades de plantas e flores, apresenta aroma amadeirado e de maçã<sup>27</sup>. Os pesquisadores avaliaram o impacto de uma mistura racêmica de nerolidol na fosforilação oxidativa das mitocôndrias isoladas de fígado de rato, eles examinaram o efeito do nerolidol nos índices respiratórios, e o potencial da membrana e a abertura da transição de permeabilidade do poro mitocondrial. Os resultados indicaram que o nerolidol aumenta a capacidade mitocondrial de acumular cálcio, diminuindo a susceptibilidade das mitocôndrias para a abertura dos póros de transição, sugerindo que este composto possa ser utilizado para prevenir o efeito deletério de alguns eventos oxidativos que ocorrem nas mitocôndrias<sup>26</sup>.

Segundo Wattenberg<sup>29</sup>, esse composto apresenta propriedade antineoplásica, e também possui efeito inibidor do crescimento do *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária e de *Leishmania amazonensis*, causador da leishmaniose tegumentar americana<sup>28</sup>.

O E-nerolidol encontrado no óleo essencial da planta *Baccharis dracunculifolia*, foi também citado como um composto de grande interesse da indústria de perfumes, em virtude de apresentar características favoráveis para atuar como fixador natural, fundamental na composição dos perfumes<sup>30</sup>.

O óleo essencial da *Baccharis dracunculifolia* D C. é considerado perfume exótico sendo exportado como matéria-prima para confecção de perfumes e tem como componentes majoritários os sesquiterpenos E-nerolidol e espatulenol<sup>31</sup>.

O nerolidol é aprovado pela agência reguladora Food and Drug (FDA) como um agente flavorizante utilizado em alimentos e mostra-se como o um agente antimicrobiano com espectro restrito<sup>29</sup>. Estudos como o de Gelinski *et al*<sup>32</sup> relataram que o nerolidol não inibiu o crescimento de algumas bactérias gram-negativas como

*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, e *Proteus* sp. Porém bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* foram sensíveis, apesar da pequena inibição apresentada. Dessa forma, o nerolidol pode ser um composto de odor ativo importante para o aroma global dessa erva. No que diz respeito às ações farmacológicas, o nerolidol é capaz de aumentar a suscetibilidade de microorganismos a agentes antimicrobianos como, por exemplo, os antibióticos<sup>33; 34; 35</sup>.

Os compostos presentes nos óleos voláteis podem agir também na proteção contra predadores, como o  $\beta$ -ocimeno, epóxido de cariofileno e espatulenol que são repelentes de formiga cortadeira de folhas por impedirem o crescimento dos fungos utilizados na sua alimentação, o mentol e a mentona são inibidores do crescimento de larvas, e certos himenopteros que sequestram  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno de *Pinus sylvestris* para protegerem as suas larvas do ataque de formigas<sup>36; 37</sup>.

O composto espatulenol é um sesquiterpenóide oxigenado outro composto majoritário dos óleos que foram analisados, é mencionado por apresentar significativas atividades biológicas, sendo destaque importante para as propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica<sup>38</sup>. Destacando-se a presença de espatulenol, o qual tem revelado múltiplas atividades biológicas, tais como inseticida, citotóxica e antimicrobiana<sup>39</sup>.

O espatulenol, além de influir no aroma de muitos óleos de interesse comercial para a indústria de perfumes, possui propriedade antibacteriana e moderada atividade citotóxica contra células do tipo KB<sup>4</sup>. Ao aroma do espatulenol pode-se atribuir as descrições odoríferas de ervas, frutas, florais e mofo<sup>40</sup>. Seu limiar de odor em água é de 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  e a concentração máxima já relatada para esse composto na camomila alemã foi de 7,4% de seu óleo essencial<sup>41</sup>.

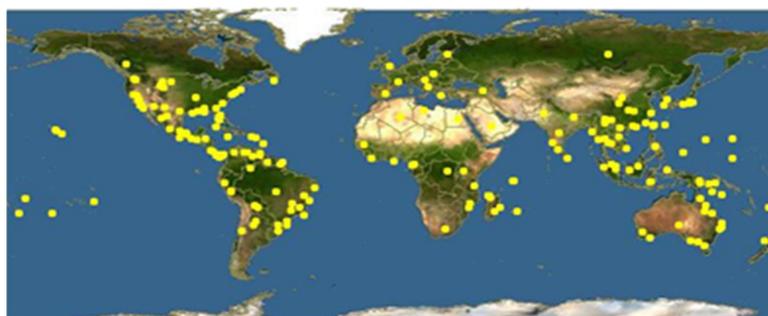
### 3.2 Família Lauraceae

O nome Lauraceae é originado do gênero *Laurus L.*, que em latim significa louro. Contudo a literatura indica que esse nome é oriundo de *laus*\_louvor, em

referência as coroas de louro que eram oferecidas a heróis com louvor em atos de bravura<sup>42</sup>.

Lauraceae Juss. pertencente à ordem Laurales<sup>43</sup>, possui distribuição pantropical sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar e pouco expressiva no sul da África (Figura 1). Compreende cerca de 50 gêneros e 2.500-3.000 espécies<sup>44</sup>. No Brasil, a família é reconhecida por 23 gêneros e 434 espécies, dos quais 18 gêneros e 125 espécies foram citados para região Nordeste do Brasil<sup>45</sup>. Os óleos essenciais de Lauraceas possuem propriedades antimicrobianas na qual se destaca a grande ocorrência no Mato Grosso do Sul<sup>4</sup>.

**Figura 1.** Mapa geográfico do Gênero Cinnamomum



As Lauraceas são representadas por árvores ou arbustos, geralmente providas de óleos essenciais e aroma característico. A família vem sendo apontada como uma das mais representativas nos inventários florísticos e fitossociológicos realizados em áreas de florestas bem preservadas da porção sudeste-sul do país, tanto em número de indivíduo quanto em riqueza de táxons. Este fato corrobora hipótese de que as regiões Sudeste e Sul do Brasil sejam um dos principais centros de diversidade da família Lauraceae<sup>46 47</sup>.

Esta família por sua vez é uma das mais importantes produtoras de óleos essenciais com elevado potencial econômico e comercial, sendo de grande relevância na indústria madeireira, principalmente para mobiliários de luxo. Cabe ressaltar que fornece ainda, óleos essenciais e alcalóides empregados na perfumaria, cosmetologia e na fabricação de fármacos<sup>48</sup>. A família Lauraceae está presente em todo o território

Nacional, porém tem sido potencializados estudos no Estado de Mato Grosso do Sul, na qual vem se destacando a atividade biológica dos seus óleos essenciais<sup>49; 4</sup>.

### 3.2.1 Gênero *Cinnamomum*

O gênero *Cinnamomum* (Lauraceae) é constituído por aproximadamente 350 espécies, muitas das quais produtoras de óleo essencial. O valor comercial dos óleos de *Cinnamomum* depende da espécie e da parte da planta utilizada<sup>50</sup>.

Este gênero se apresenta em várias regiões do mundo e vasta distribuição pelas Américas. No Brasil pode ser destaque em diversos biomas. Dentre as espécies pertencentes a este gênero pode-se destacar as *Cinnamomum zeylanicum*, *Cinnamomum verum*, *Cinnamomum burmanni*, *Cinnamomum canphora* e *Cinnamomum cassia*, estão entre as espécies estudadas recentemente que apresentam potencial antimicrobiano e ou citotóxico<sup>51;52; 53;4</sup>.

### 3.2.2 Espécie *Cinnamomum triplinerve*

A Espécie *Cinnamomum triplinerve* (Ruiz Pav.), é conhecida popularmente como falsa congonheira ou canela fedorenta dependendo da região, que apresenta alguns sinônimos entre eles: *Cinnamomum brasiliensis*, *Laurus triplinerves*, *Phoebe brasiliensis*<sup>54</sup>.

É uma árvore com grande distribuição pelas Américas, sendo que no Brasil pode ser encontrada na mata atlântica, amazonia e cerrado. É uma espécie de difícil identificação no campo, o que exige uma combinação de caracteres particulares para fazer uma identificação confiável<sup>54</sup>.

Apresenta-se como árvore de grande porte podendo chegar a 10 m de altura, conforme evidenciado na Figura 2.

**Figura 2.** Árvore da espécie *Cinnamomum triplinerve*



**Fonte:** Arquivo pessoal, 2016

A espécie *Cinnamomum triplinerve*, ainda não tem descrita a composição química de seus óleos voláteis, o qual é objetivo deste trabalho juntamente com análises preliminares do potencial antimicrobiano, antineoplásico e citotóxico do óleo extraído das folhas dessa espécie da família Lauraceae.

### **3.2.3 Farmacobotânica da *Cinnamomum triplinerve* “canela fedorenta”**

Árvores monóicas, que apresentam-se com 7–10 m de altura, com ramos angulosos e pilosos com folhas alternas em todo o ramo, cartáceas, lanceolado, ovaladas a elípticas, medindo 7,5–12 × 3–5,5 cm, base cuneada, ápice agudo ou acuminado, padrão de nervação acródromo imperfeito, reticulado denso, domácias em tufo de pêlos nas axilas de nervuras secundárias. Inflorescência panícula axilar, apresentando suas flores monóclinas, tépalas subiguais, pubescentes com estames com anteras quadrilocelares, 1ª e 2ª séries com filetes evidentes, mais delgados que anteras, anteras triangulares, estames da 3ª série com par de glândulas triangulares na base, anteras triangulares, 4ª série estaminodial bem desenvolvida triangular ou cordada. Ovário globoso, com fruto bacáceo, elipsóide, sobre cúpula pateliforme de margem simples, tépalas persistentes, caracteriza-se por apresentar ritidoma pardo-claro e casca de cor creme com lenticelas transversais, folhas com superfície abaxial papilosa, folhas

trinérveas com domácias na axila de nervuras secundárias, flores com anteras quadrilocelares, estaminódios da 4ª série triangulares ou cordados, e frutos bacáceos elipsóides sobre cúpula com tépalas persistentes<sup>47</sup>.

### 3.3 Atividade biológica

#### 3.3.1 Atividade antibacteriana

Os microrganismos utilizados nos experimentos de avaliação da atividade antimicrobiana foram escolhidos por serem as bactérias empregadas rotineiramente para esse tipo de estudo, sendo também responsáveis por várias formas de infecções em seres humanos e adquirir, com mais frequência, resistência aos antimicrobianos<sup>55</sup>.

As taxas de resistência bacteriana registradas nos hospitais têm sido crescentes, o que tem despertado a atenção e preocupação dos profissionais da saúde. Além disto, bactérias originárias de ambientes não hospitalares carreadoras de genes multirresistentes tornam as infecções bacterianas cada vez mais difíceis de serem tratadas, aumentando ainda os riscos para pacientes internados e imunossuprimidos. Além de permitir a sobrevivência em ambientes considerados tóxicos às bactérias, mecanismos de resistência podem contribuir com fatores de virulência, regulação da homeostase bacteriana e desintoxicação de metabólitos intracelulares. O surgimento e a disseminação de resistência bacteriana ocorrem por diferentes mecanismos normalmente relacionados à pressão seletiva e também devido ao uso incorreto de antibióticos<sup>56</sup>.

Portanto, o uso de óleos essenciais para o controle de microrganismos vem sendo ampliado, devido principalmente à busca por substâncias alternativas para o controle dos mesmos contra resistência à antibióticos<sup>57</sup>.

Os terpenóides e compostos fenólicos são os responsáveis pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais, que possuem seu mecanismo de ação associado ao caráter lipofílico dos compostos, os quais se acumulam nas membranas, havendo perda de energia pelas células microbianas<sup>58</sup>.

Em 2000 estudos realizados por Dorman e Deans<sup>12</sup> relataram que, a maioria dos óleos essenciais provavelmente, exerce efeito antimicrobiano, afetando a estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Nesse contexto, a exploração dos óleos essenciais forma um dos grupos de compostos naturais com maior potencial para o desenvolvimento de produtos para o controle de patogenias.

Um dos pontos que o presente estudo pode contribuir está na possível descoberta de atividades biológicas de novos agentes, sendo de extrema importância principalmente no Brasil que oferece uma vasta biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento de novos fármacos ou no conhecimento de agentes fitoterapêuticos através da busca de substâncias menos tóxicas e inviabilidade de resistência dos microrganismos patogênicos<sup>59; 60; 9</sup>.

Um grupo de microrganismo distinto é o coliforme, bactérias gram-negativas, anaeróbias, facultativas, em forma de bastonetes. Também são conhecidos como *coli-aerogenes*. Os critérios utilizados para identificação são a produção de gás proveniente da glicose e a fermentação da lactose com produção de ácido lático e gás carbônico. O grupo coliforme inclui espécies dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*<sup>56</sup>.

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies, das quais a *Escherichia coli* é o mais comum e clinicamente importante. Este microrganismo está associado a uma série de doenças tais como meningite e gastroenterite<sup>61</sup>.

As doenças mais comuns incluem bacteremia, osteomielite, pneumonia e septicemia. No entanto, a esta linhagem também provoca infecções gastrointestinal, respiratória, urinária e na pele. Sendo, portanto, um patógeno oportunista, isto significa que ele infecta um hospedeiro já enfraquecido. Ela também é uma bactéria nosocomial, o que significa que geralmente reside nos hospitais. Conseqüentemente, seus fatores de risco incluem internação hospitalar que duram duas semanas ou mais, cirurgia invasiva, visitas de terapia intensiva e uso de antibióticos<sup>56</sup>.

Os *Enterococcus faecalis* são habitantes naturais do trato gastrointestinal dos seres humanos e animais, porém podem ser encontrados em outras partes da região

corpórea. Está entre as espécies mais importantes e principal causa de infecções oportunistas nos seres humanos, incluindo infecções urinárias, infecções de risco cirúrgico, queimaduras, feridas, bacteremia, endocardite e meningite neonatal são partes da vasta gama patogênica que esta linhagem pode causar. As infecções graves causadas por enterococo são difíceis de tratar devido à capacidade do organismo para resistência intrínseca a muitos antimicrobianos e a produção de enzimas extracelulares e toxinas que agravam a infecção<sup>62</sup>. Sendo assim, fatores de virulência contribuem para a patogênese causada por enterococos: a colonização e invasão nos tecidos do hospedeiro, a modulação do hospedeiro a imunidade, e a produção de enzimas extracelulares e toxinas, aumentam a gravidade da infecção<sup>63</sup>. Muitos fatores de virulência, tais como a proteína de superfície de enterococos sp, substância de agregação bem como, formação de cápsula e gelatinase, estão envolvidos na adesão bacteriana sobre as células hospedeiras ou na formação de biofilme em superfícies abióticas no hospital<sup>64;65</sup>. A produção de biofilme no ambiente hospitalar tem um importante papel na patogênese de infecções por enterococos e também favorece o sustento da doença por causa da penetração restrita<sup>66; 62</sup>.

O nome *Staphylococcus* origina-se do grego *sthapylé* que significa cacho de uvas, isso se deve ao fato de que os cocos gram-positivos são dispostos em cachos irregulares semelhantes a cachos de uva. O gênero *Staphylococcus* é constituído por cerca de 32 espécies sendo algumas patogênicas<sup>61</sup>. *Staphylococcus aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não formadoras de esporos, algumas cepas são produtoras de enterotoxinas termoestáveis, sendo considerado atualmente o maior causador de intoxicações, pois algumas cepas são capazes de produzir enterotoxinas, nas diferentes etapas de processamento dos alimentos<sup>67; 14</sup>.

Em relação à linhagem bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* compreende um grupo de bactérias gram negativas pertencente à família Enterobacteriaceae, resistente aos carbapenêmicos<sup>68</sup>. Tal microrganismo é um importante patógeno, causador de várias infecções, incluindo pneumonias, bacteremia, infecções purulentas e urinárias, podendo ocorrer em ambientes hospitalares. Diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*

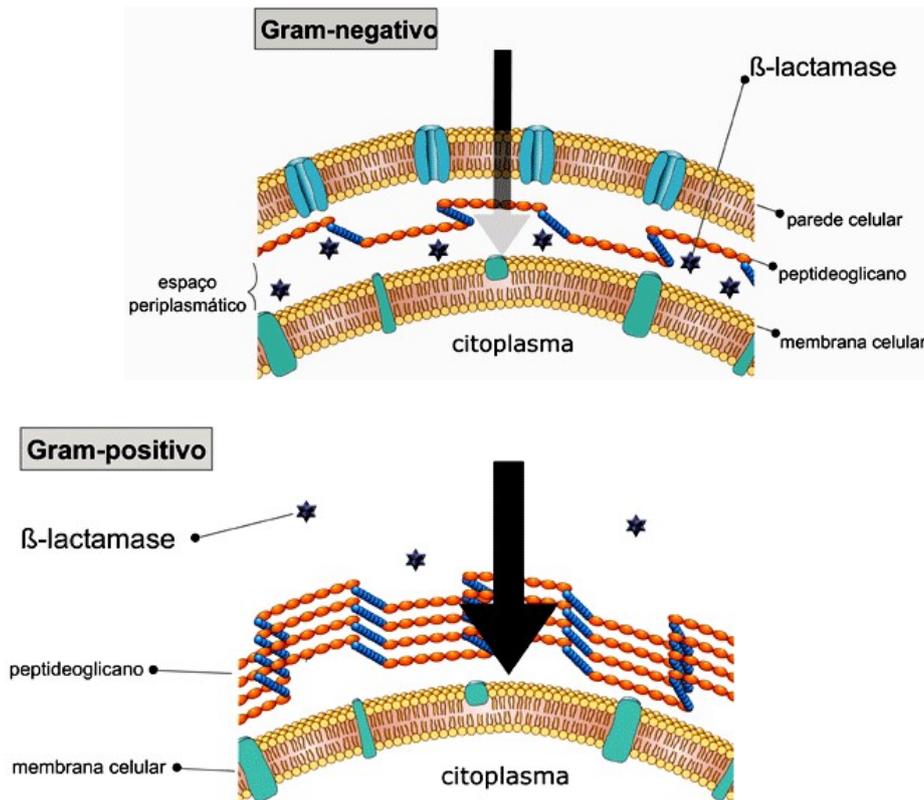
mostram-se resistentes a ampicilina e aumentam a resistência a carbapenemos representando uma ameaça real entre as espécies. A mesma representa um aumento no dilema terapêutico devido a sua resistência prolongada e capacidade de disseminar rapidamente<sup>69</sup>.

Infecções causadas por microrganismos multirresistente são difíceis de tratar, levando a uma mortalidade e morbidade significativa sem contar com um excessivo e prolongado tempo de hospital, ocasionando custos elevados. O aumento da resistência antimicrobiana representa uma séria ameaça em todo o mundo, especialmente, em relação a algumas linhagens gram-negativas. O uso excessivo e a utilização indevida de agentes antimicrobianos é o componente vital para o surgimento e propagação de microrganismos multirresistentes. Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a associação entre antibiótico-consumo-resistência, neste quesito entram as fontes alternativas como fitoterapia como agente antibacteriano<sup>70</sup>.

As bactérias estão aptas a viverem em ambientes com concentração de solutos muito menores que as do seu citoplasma graças à presença de um envoltório rígido, a parede celular. A parede celular das bactérias gram-negativas, possui composição química mais complexa que a parede celular das gram-positivas. Na maioria das bactérias gram-negativas representadas por *Escherichia coli*, a camada de peptidoglicano difere um pouco das apresentadas pelas bactérias gram-positivas: como não existem peptídios interligantes, tetrapeptídios, situados em planos paralelos ao polissacarídeo, de modo a poderem ligar-se uns aos outros<sup>56</sup> (Figura 3).

Por sua vez a membrana externa constitui uma barreira protetora adicional, sendo que o caráter hidrofóbico dos fosfolipídios torna a membrana externa impermeável a várias substâncias, impedindo-as de atingir a célula gram-negativa com a facilidade que atingem a gram-positiva. Assim, as bactérias gram-negativas ficam protegidas de vários antibióticos. Algumas bactérias gram-negativas apresentam toxinas solúveis, geralmente proteínas, porém todas apresentam uma endotoxina, constituída pela porção lipídica, sendo que sua liberação ocorre quando a célula é lisada, tornando-a mais resistente<sup>70</sup> (Figura 3).

Figura 3. Diferenças nas estruturas de bactérias gram-positivas e gram-negativas



Fonte: ANVISA, 2007 <sup>71</sup>

Guimarães *et al* afirmam que em decorrência da natureza complexa da parede celular das bactérias Gram-negativas, essas são mais resistentes à ação de antibióticos, que não são capazes de atravessar efetivamente a barreira lipídica da camada externa dessas bactérias, portanto, estes estudos corroboram com os resultados encontrados na presente pesquisa<sup>72</sup>.

Os métodos de triagem atualmente disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais se dividem em três grupos, incluindo os métodos de bioautografia, difusão, e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas vez que estes métodos servem para verificar a presença ou ausência de substâncias com atividades antimicrobianas. Por outro lado, métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, uma vez que pode

determinar a concentração inibitória mínima<sup>73;74</sup>. As atividades antimicrobianas relatados na literatura foram avaliadas com diversos conjuntos de metodologias, graus de sensibilidade, a quantidade de compostos testados e linhagens microbianas.

Sendo assim, paralelamente, a busca de antimicrobianos de origem natural que apresentam atividade sobre grande espectro de microrganismos e que possam ser usados como alternativa aos antibióticos convencionais vem sendo despertado o interesse da classe científica, sobretudo nas moléculas de origem vegetal já que as plantas possuem elevado potencial de sintetizar substâncias químicas de defesa contra agentes patogênicos<sup>59;75</sup> sendo, uma possível alternativa para os microrganismos resistentes.

### **3.3.2 Interações medicamentosas de antimicrobianos**

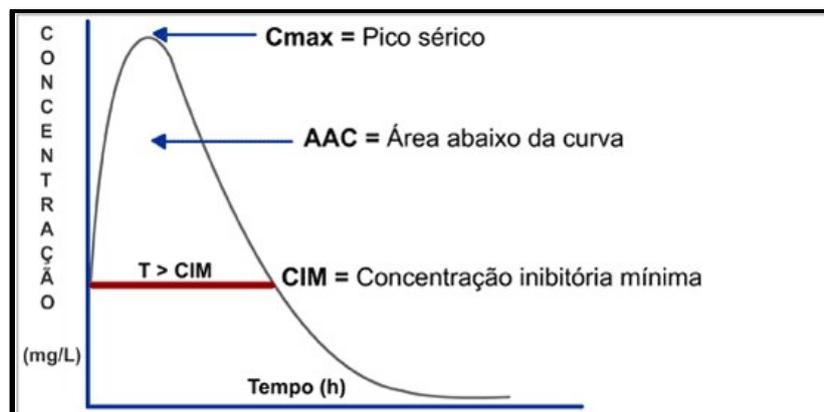
A farmacocinética estuda a atividade do antimicrobiano no interior do organismo a partir dos parâmetros de velocidade de absorção, distribuição e eliminação da droga e de seus metabólitos. Com os conhecimentos de farmacocinética e das características do microrganismo frente ao antimicrobiano, é possível adequar posologia, via de administração e intervalo entre cada dose, visando melhorar resultado terapêutico e, ao mesmo tempo, reduzir a probabilidade de desenvolver efeitos tóxicos potenciais<sup>76</sup>.

A fitoterapia proporciona o tratamento de uma dada doença mediante o uso de plantas. Pode-se dizer então que a fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais<sup>2</sup>.

Após a administração de dose padronizada de um antimicrobiano, sua concentração plasmática aumenta rapidamente, até atingir a concentração sérica máxima; depois disso, na medida em que se distribui entre os tecidos são eliminados ou metabolizados, sua concentração no sangue vai diminuindo progressivamente até se tornar nula. A concentração do antimicrobiano detectada no sangue antes da

administração da dose seguinte (respeitando o intervalo padronizado) corresponde à concentração sérica mínima<sup>76</sup> como representado na Figura 4.

**Figura 4.** Representação gráfica dada pela curva de concentração sérica-tempo sob o efeito do antimicrobiano no organismo.



Fonte: ANVISA, 2008<sup>76</sup>.

Emitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a RDC nº 48, de 16 de março de 2004, classifica o medicamento fitoterápico como aquele obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Essa RDC não considera medicamento fitoterápico aquele que inclua substâncias ativas isoladas na composição, nem as associações destas com extratos vegetais. A eficácia e segurança são validadas em levantamentos etno- farmacológicos de utilização, documentações tecno-científicas em publicações ou ensaios clínicos<sup>77</sup>.

O tratamento das infecções bacterianas é baseado numa ação sobre o agente etiológico, através de uma interferência sobre mecanismos celulares essenciais a sua sobrevivência, bem como de uma ação corretiva ou supressora dos fatores predispostos à instalação do processo infeccioso. O uso de antimicrobianos necessita de critérios rigorosos, por conta dos efeitos colaterais produzidos pela grande maioria desses compostos. Vale ressaltar que as pesquisas têm revelado muitas substâncias possuidoras de ação inibitória sobre uma variedade de microrganismos<sup>78</sup>.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo teste, esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) um aspecto bastante relevante em determinação da CIM de extratos vegetal é a preocupação em relação a aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais, pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações<sup>60</sup>.

Os óleos essenciais constituem múltiplas moléculas variáveis e bioativas, agindo em células alvos diretamente na membrana citoplasmática. A ruptura e a permeabilidade da membrana celular levam à perda de funções celulares importantes, como homeostase iônica e cadeia de transporte de elétrons. Os óleos essenciais podem exercer efeitos citotóxicos em células carióticas bem como permeabilização de membranas mitocondriais externas e internas que leva a causa morte celular por necrose e apoptose<sup>79;9</sup>.

O método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir o crescimento de um microrganismo. Os procedimentos para determinar a atividade inibitória podem ser realizados pela técnica de diluição em caldo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerado como concentração inibitória mínima<sup>80</sup>.

A resazurina sódica é um corante azul indicador de óxido redução, onde a coloração azul é interpretada como inibição de crescimento, enquanto o desenvolvimento de coloração rosa indica presença de células viáveis. A menor concentração da droga que inibe o crescimento é considerada como Concentração Inibitória Mínima (CIM)<sup>78</sup>.

Para Nascimento *et al*, os métodos de atividade antimicrobiana (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Isto porque o método de diluição mostra ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto que, a difusão em ágar, se constitui em um método qualitativo. Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido aos fatores intrínsecos dos testes<sup>81</sup>.

A utilização estratégica para bioensaios, com as três metodologias abordadas no referente trabalho, para rastreamento de compostos antimicrobianos em misturas complexas, tais como os óleos essenciais constituem uma abordagem amplamente consagrada, ainda que bastante preliminar, por não fornecer o mecanismo de ação dos compostos testados<sup>8</sup>. Entretanto, dado o custo relativamente baixo se comparado a ensaios mais específicos, estas análises em conjunto são insuperáveis no contexto de triagem, sendo para tanto utilizadas para as amostras selecionadas no presente trabalho.

### 3.4 Atividade antineoplásica e citotóxica

Neoplasia significa novo crescimento (NEO = novo, PLASIA = formação), é caracterizada como a perda do equilíbrio entre proliferação e morte celular formando assim, um emaranhado de células organizadas ou desordenadas, que constituem o tumor, onde este por sua vez está relacionado à tumefação da inflamação. A oncologia é a ciência que estuda os tumores e as neoplasias e os classifica como benignos ou malignos<sup>82</sup>.

O câncer é uma palavra originada do latim que deriva do termo grego *cracinus*, que significa caranguejo, assim denominada a partir de observações morfológicas comparativas entre a capacidade de aderência da célula cancerígena e a obstinação de um caranguejo quando se agarra a algo, realizadas por Hipócrates em torno de 460-370 a.C.<sup>83</sup>. Tem como característica essencial ser um conjunto de doenças celulares, ocasionada por acúmulo de mutações genéticas e ruptura dos mecanismos de regulação epigenética, que proporciona desvios nos mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação celular<sup>84;86</sup>.

O Gênero *Cinnamomum* está entre as plantas medicinais mais utilizadas com diversos efeitos bioativos. No entanto, pouca evidência tem sido relatada sobre o potencial efeito antitumoral. No sistema *in vitro* e *in vivo*, o tratamento com *Cinnamomum cassia* inibiu fortemente a expressão de fatores pro-angiogênicos e reguladores da progressão tumoral não apenas em linhagens celulares de melanoma como também no modelo experimental *in vivo*. Além disso, o tratamento com

*Cinnamomum cassia* aumentou a atividade antitumoral das células T CD8 +, aumentando os níveis de moléculas citolíticas. Pode-se concluir que atividade citotóxica do extrato de *Cinnamomum cassia* tem potencial para ser um medicamento alternativo em tratamento de tumores<sup>52</sup>.

No teste de citotoxicidade baseado na coloração, as células são primeiramente submetidas a condições adequadas de crescimento têm sua intensidade quantificada que é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Em seguida é feita a comparação desses resultados na presença ou ausência de uma substância-teste<sup>85</sup>.

O ensaio de sulforodamina B detecta quantitativamente a proliferação e sobrevivência das células, a mesma se liga a componentes protéicos das células, ou seja, cora proteínas celulares fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA), sendo independente do metabolismo celular. Este método permite a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a pesquisa de amostras com maior especificidade. Outra vantagem é a rapidez e a eficiência do método, que em poucos dias pode avaliar um número elevado de amostras<sup>87;111</sup>.

### 3.4.1 Tratamento contra neoplasias

Atualmente o carcinoma é considerado o mais grave problema de saúde mundial embora, uma vasta diversidade de agentes antitumorais estejam disponíveis os efeitos colaterais graves e a toxicidade limitam suas aplicações. Recentemente a medicina complementar e alternativa (CAM) vem se tornando um tratamento eficaz para vários tipos de câncer<sup>86</sup>.

Parte significativa da descoberta científica de drogas nas últimas décadas tem sido focada em agentes para prevenir ou tratar o câncer. O tratamento pode ser realizado por terapias sistêmicas (quimioterapia, terapia hormonal, terapia alvo e imunoterapia) ou local (cirurgia, radioterapia e fototerapia ou associações desses tratamentos)<sup>85</sup>.

O principal objetivo da quimioterapia contra o carcinoma é erradicar células neoplásicas sem prejudicar as células normais. Infelizmente, a ciência ainda não tem

meios disponíveis que minimizam esse critério, e o uso clínico dessas drogas exigem que os benefícios sejam controlados com a toxicidade na procura de um agente terapêutico favorável<sup>87;88</sup>.

Uma revisão de Newman e Cragg<sup>88</sup> apresentou uma lista de todos os fármacos desenvolvidos e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) entre os anos de 1981 a 2006 e concluiu que um significativo número desses fármacos são produtos naturais produzidos por micro-organismos ou pela interação dele com o local em que foi isolado.

Para o tratamento do câncer, estima-se que mais de 60% dos fármacos usados são provenientes de fontes naturais<sup>89; 88</sup>. Drogas como a Vincristina e vimblastina, isoladas da *Catharantus rose*<sup>88; 90</sup> são exemplos de fármacos de origem natural utilizados em quimioterapia. A química de produtos naturais constitui uma das principais linhas de pesquisa na busca de novos agentes *antineoplásicos*<sup>91;92</sup>.

O OE tem atraído considerável interesse devido à diversidade de seus constituintes bioativos, os quais desempenham um importante papel na prevenção e tratamento do câncer<sup>93</sup>. Alguns estudos com óleos essenciais apresentam atividade antitumoral ou citotóxica comprovadas como a *Croton regealiamus*<sup>94</sup>, *Cedrelosis grevei*<sup>95</sup>, *Guatteria hispida* e *Guatteria blepharophylla*<sup>96</sup>, *Lindera umbellata*<sup>97</sup>, *Guatteria pogonopus*<sup>98</sup>, *Lippia gracilis*<sup>99</sup>, *Xylopi laevigata*<sup>100</sup>, *Xylopi frutescens*<sup>101</sup> e *Santureja intermedia*<sup>102</sup>. Alguns constituintes isolados de OE apresentam atividade anticâncer comprovada como timol, carvacrol,  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -terpinoleno, 1,8-cineol, mentona, isomentona,  $\beta$ -terpeno, 4-terpineol, cariofileno e borneol<sup>93</sup>.

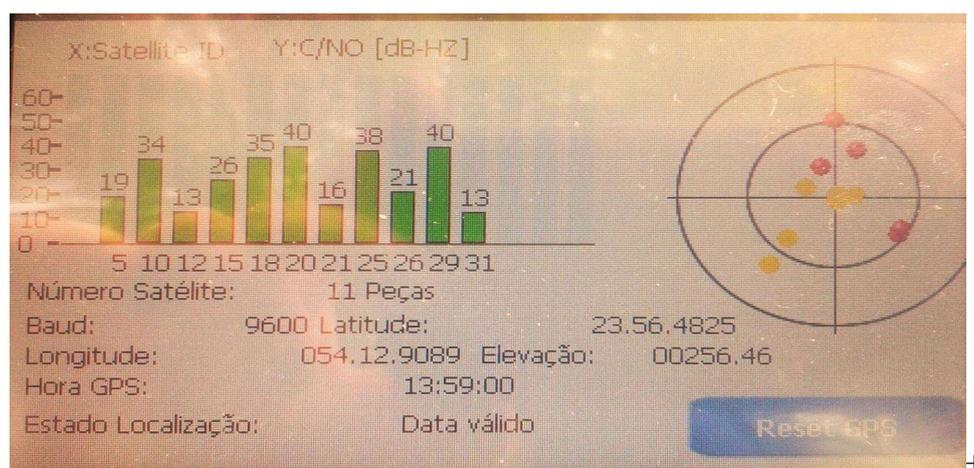
O Estado de Mato Grosso do Sul apresenta uma flora rica e diversificada, fonte de inúmeras espécies que podem ser exploradas na busca de novas substâncias com atividade biológica, com destaque para algumas espécies pertencentes às famílias Lauraceae, Annonaceae, Apocynaceae e Asteraceae. Através de estudos biomonitorados podem-se proporcionar mecanismos em busca de novas substâncias bioativas, especialmente contra o câncer<sup>103; 104; 49</sup>.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material botânico

As folhas de *Cinnamomum triplinerve* (canela fedorenta), foram coletadas no município de Mundo Novo situado no Estado de Mato Grosso do Sul, sob as coordenadas geográficas de: Latitude 23°56'48" e Longitude 054° 12' 90" a 256.46 m de altitude como segue a Figura 5.

**Figura 5.** Coordenadas Geográficas do ponto de coleta no Município de Mundo Novo-MS



Fonte: Arquivo pessoal, 2016

### 4.2 Material biológico

Visando analisar a ação do óleo essencial da folha da espécie *Cinnamomum triplinerve* frente a diversas linhagens bacterianas, foram selecionadas para a presente pesquisa as cepas, mostradas no Quadro 1.

Para usos nos bioensaios estas bactérias foram reconstituídas em solução salina 0,8% estéril, semeadas em meio de cultura Mueller Hinton e incubadas a 36°C por 24 h.

**Quadro 1.** Cepas bacterianas empregadas nos bioensaios. CCBH- Coleção de Cultura Bacteriana de Origem Hospitalar, doadas pela Fundação Fiocruz; CCCD Coleção de Cultura Cepar Diagnóstica (comercial).

<b>CEPAS</b>	<b>Gram</b>	<b>ORIGEM</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	CCBH 17832
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	CCBH 3450
<i>Escherichia coli</i>	-	CCBH 19557
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	CCCD E 006
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	CCCD S 007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	CCCD P 008
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	CCCD E 001

CCBH – Centro de Cultura de Origem Hospitalar – Fundação Osvaldo Cruz

CCCD – Centro de Cultura Cepar Diagnóstica

### 4.3 Reagentes

Na realização do teste de sensibilidade antimicrobiana por disco de difusão, foram utilizados antibióticos de uso clínico em forma de discos antimicrobianos comerciais conforme ilustrado no Quadro 2 a seguir:

**Quadro 2.** Disco antimicrobiano comercial utilizado na técnica de disco de difusão em ágar

<b>ANTIBIÓTICO</b>	<b>CONTEÚDO DO DISCO</b>	<b>MARCA / DIÂMETRO</b>
CLORANFENICOL (CLO)	10µg	CEFAR / 6,25mm

Foram utilizados os seguintes reagentes, materiais e equipamentos como demonstrado nos Quadros 3, 4 e 5:

**Quadro 3.** Reagentes utilizados para a triagem antibacteriana

REAGENTES	MARCA	LOTE
Cloreto de Sódio P.A. 250g	Dinâmica	582.17
Meio de Cultura Müller Hinton 500g	Kasvi	111.714.212
Meio de Cultura Lúria Bertani	Kasvi	012.215.213
Tween 80 1000 MI	Vetec	110.347.6
Resazurina sódica 5g	Sigma	MKBT 9691V
Álcool ABS 1000 mL	Dinâmica	553.67

**Quadro 4.** Materiais utilizados para a triagem antibacteriana

MATERIAIS	MARCA	LOTE
Micropipeta vol 10-100 µL	Kasvi	152.103
Placa para cultivo de células 96 poços	Kasvi	140.901-078 Anvisa
Papel filtro qualitativo	J Prolab	1B4E19
Swab estéril por radiação gama	Absorve	140.8P

## 4.4 Equipamentos

**Quadro 5.** Equipamentos utilizados nas análises

EQUIPAMENTOS	MARCA	MODELO
Agitador de tubos vórtex	Phoenix	AP 56
Autoclave Vertical	Phoenix Lufenco	AV-30
Balança semi-analítica	Weblaborsp	L303i
Contador de colônias	Phoenix Lufenco	CP 600 plus
Estufa de esterilização e secagem	Marconi	MA033
Estufa de incubação 36° C	DELeo	HW4900
Estufa de incubação Shaker 30°C	Solab	SL222
Paquímetro digital	Insize	100.712.319.8

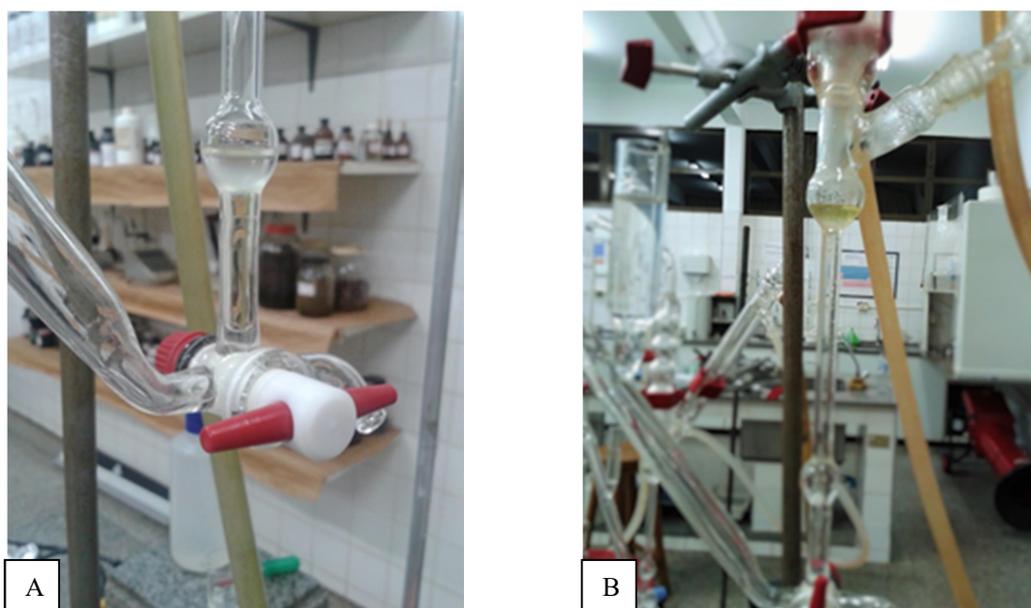
## 4.5 Coleta e extração do óleo essencial

As extrações foram realizadas no laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) na unidade de Naviraí-MS, por hidrodestilação em sistema tipo Clevenger conforme demonstrado na Figura 6.

Foram realizadas diversas coletas das folhas da espécie *Cinnamomum triplinerve*, tanto *in natura* quanto as folhas secas e levadas ao laboratório, onde foram extraídos o óleo essencial por hidrodestilação até um volume suficiente para realização das análises químicas e bioológicas a serem desenvolvidas.

As folhas *in natura* foram coletadas sob as mesmas coordenadas geográficas das folhas secas, vale ressaltar que estas encontravam-se em galhos da árvore sob o solo úmido e sombreado, conectados ao tronco da árvore caída, sendo assim folhas secas foram consideradas aquelas retiradas de galhos secos da própria matriz arbórea.

**Figura 6.** Extração do óleo essencial por hidrodestilação das A) folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*. B) folhas secas de *Cinnamomum triplinerve*.



Fonte: Arquivo pessoal (2006)

Para o cálculo de rendimento foi obtida a massa das folhas que teve uma variação entre 200g a 700g de material bruto (folhas secas e *In natura*), conforme cada amostragem de extração.

O rendimento dos óleos essenciais foi calculado pela seguinte fórmula<sup>69</sup>:

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\text{Massa do óleo (g)}}{\text{Massa das folhas (g)}} \times 100$$

## 4.6 Análises cromatográficas

### 4.6.1 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID)

As análises das amostras foram realizadas em um sistema de cromatografia a gás SERIE II HP5890 equipado com um detector de ionização de chama (FID) utilizando uma coluna capilar de sílica fundida (ZB-5, 30 m/0,25 mm, espessura de filme 0,25  $\mu\text{m}$ ). A temperatura do forno foi programada de 50 a 250 ° C a uma taxa de 3 ° C  $\text{min}^{-1}$ , com temperaturas do injetor e do detector de 240 ° C e 250°, respectivamente. A razão de divisão foi (1:50). O volume injetado foi de 3,0  $\mu\text{L}$ .

Preparou-se uma mistura de n-alcanos C7-C21 diluída em n-hexano para a determinação dos índices de retenção programados de temperatura. As amostras foram analisadas em solução de acetato de etila. Foram então adicionados padrões internos (n-alcanos) a cada amostra para auxiliar na padronização dos tempos de retenção e as amostras analisadas novamente.

As concentrações dos constituintes voláteis foram obtidas por normalização da área de pico utilizando GC-FID operando em condições semelhantes à do GC-MS. Os compostos com concentrações iguais ou superiores a 0,1% foram considerados para quantificação.

### 4.6.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS)

A análise de CG-MS foi realizada no Complexo Multidisciplinar de Apoio a Pesquisa (COMCAPE) da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em um cromatógrafo a gás acoplado a uma espectrometria de massa (CG-MS Thermo-Finnigan, Focus DSQII), com um analisador de massa quadripolar, ionização por impacto de elétrons (70 e V), e amostrador automático modelo Triplus.

A análise foi realizada utilizando uma coluna capilar DB-5 (espessura de 30m x 0,25 mm DI x 025µm). Utilizou-se o gás Hélio de grau 5.0 analítico como gás de suporte a uma taxa de fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A entrada foi operada em modo de divisão (razão 1:15) com volume de injeção de 2,0 µL do óleo diluído em acetato de etila.

O programa de temperatura do forno utilizado foi 60°C, 1°C min e 3°C min até 260°C. As temperaturas do injetor, da fonte de ionização e da linha de transferência foram ajustadas até 260°C.

A aquisição de dados foi realizada pelo Software Xcalibur 1.4 SRI. A análise dos dados foi realizada pela Biblioteca NIST MS Serach 2.0

Em seguida, foram determinados os índices de retenção (RI) para todos os compostos. A identificação dos constituintes químicos baseou-se na comparação dos seus índices de retenção (IR) e espectro de massa com os obtidos a partir de amostras autênticas das bibliotecas Wiley e NBS / NIST e a publicada por Adams<sup>105</sup>.

Além da biblioteca NIST foi realizado o cálculo do índice de retenção (IK), utilizando uma mistura de padrão de uma série homóloga de hidrocarbonetos C7- C30 (Sigma-Aldrich). Foi utilizado o IK, que se deu através da fórmula, mostrada a seguir:

$$I_k = 100. n + \frac{(TR1 - TR2)}{TR3 - TR2} \times 100$$

Em que:

IK= índice de retenção de Kratzs

n = número de carbonos do alcano que elui antes do pico de análise

Tr1=tempo de retenção do pico em análise

Tr2 = tempo de retenção do alcano que elui antes do pico em análise;

Tr3= tempo de retenção do alcano que elui depois do pico base.

## 4.7 Atividade antimicrobiana

### 4.7.1 Bioautografia direta

Esta é uma técnica qualitativa uma vez que dá a percepção de presença e/ou ausência de substâncias com agentes antimicrobianos. Na bioautografia direta o inóculo é inserido sobre a cromatoplaça de camada delgada (CCD) contendo a amostra, onde será observada a inibição do microrganismo, enquanto que a bioautografia indireta pode ser feita a eluição da amostra separando os compostos na sua respectiva ação<sup>74</sup>.

Os ensaios de determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia foram desenvolvidos pelo método direto. As amostras em solução foram aplicadas em CCD (comercial), em uma série de concentrações na faixa de 1,0 µL, 5,0 µL e 10,0 µL para 10 mL de meio de cultura com um inóculo de  $1,0 \times 10^4$ . Para cada cromatoplaça foi aplicado um padrão com a maior concentração de 10,0 µL do antibiótico, polimixina B, de acordo com o microrganismo a ser testado. Para a realização do teste foram utilizadas placas de Petri (10 x 100 mm), sobre as quais foram depositadas as cromatoplaças com as amostras aplicadas, e 10,0 mL do meio de cultura adequado, estes já contendo a suspensão com microrganismo indicador. Após solidificação dos meios, as placas foram incubadas na posição invertida por 16 à 24 horas, a uma temperatura de 30°C para a *Pseudomonas fluorescens* e 36°C para as demais linhagens. Decorrido o período de incubação, as placas foram reveladas com uma solução aquosa de resazurina sódica a 0,01% ( $5\text{mg mL}^{-1}$ ). Foi incubada por mais 4 h para revelação e posterior leitura dos halos de inibição, classificando-as em ativo ou inativo.

### 4.7.2 Difusão em disco

Utilizou-se o método de difusão em disco de ágar adaptado e aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido como padrão pelo National Committe

for Clinical Laboratory (NCCLS)<sup>106</sup>, para triagem de atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas secas e *in natura* pertencente à espécie *Cinnamomum triplinerve*. As culturas de bactérias foram preparadas inoculando placas Müller Hinton Ágar (MHA) comercial contendo os organismos de teste, e depois incubando as placas a 36°C durante 24 h. A turvação de cada cultura foi ajustada para uma densidade óptica semelhante ao de McFarland 0,5<sup>102</sup>.

Para o ensaio de difusão em disco utilizou-se um disco de papel de filtro estéril (6 mm de diâmetro) impregnado com 5,0µL de óleo essencial e colocada sobre o inóculo contido na placa placa de ágar com uma ligeira pressão. Utilizou - se como controle positivo os discos de cloranfenicol (75 g/disco), e como controle negativo a água destilada esterilizada (5,0 µL). Todas as placas inoculadas foram incubadas a 36°C durante 24 h, com exceção da linhagem de *Pseudomonas fluorescens*, incubada a 30° C por 24h. Após o período de incubação realizou-se a leitura do diâmetro dos halos formados nos discos através de paquímetro digital<sup>106;102</sup>.

Para o ensaio de difusão em ágar foi aplicada a análise de estatística de variância, onde os dados relativos a esta atividade foram submetida aplicada à diferença entre as médias e calculado o desvio padrão entre as mesmas.

#### 4.7.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As culturas de bactérias foram preparadas pela inoculação em placas Müller Hinton Ágar (MHA), a partir das cepas liofilizadas comerciais, com auxílio de swab estéril foi retirada uma alíquota a qual foi inserida em 4,0 mL de solução salina, sendo que em seguida a mistura foi agitada em vortex por 10 segundos; com o mesmo swab, retira-se o excesso na borda do tubo e faz-se a inoculação em placas, incubando as mesmas a 36°C durante 24 h. Após as 24 h foram retiradas de 4 a 5 colônias que foram inseridas na solução salina, sendo ajustada a turvação de cada cultura para uma densidade óptica semelhante à escala 0,5 de Mc Farland<sup>107;108</sup>.

Sendo assim, para as avaliações de CIM foram selecionadas as bactérias citadas no Quadro 1, onde foram submetidas a triagem utilizando o método de microdiluição em placas de 96 poços estabelecido pela National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS)<sup>107</sup> e adaptado de acordo com Freire<sup>108</sup>.

A suspensão bacteriana foi obtida em solução salina com turvação correspondente ao inóculo de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Os óleos foram inicialmente diluídos em água destilada estéril, obtendo-se a concentração de 16%. Para obtenção dessas diluições considerou-se a densidade das substâncias igual a  $0,9 \text{ g mL}^{-1}$ . Foram adicionados em tubos de vidro estéril: 0,8mL do óleo, 0,05 mL de Tween 80 e 4,2 mL de água destilada estéril. O conjunto foi agitado durante 5 minutos em agitador de tubos vórtex e a concentração final obtida foi de  $144 \text{ mg mL}^{-1}$  (16%). Em cada um dos poços das placas de microdiluição foram inseridos 100  $\mu\text{L}$  de caldo Müller-Hinton, e seguida inseriu-se 100  $\mu\text{L}$  da emulsão dos óleos para obtenção da concentração inicial de 8% ( $72 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) isto para a primeira linha da placa de microdiluição. Foi inserido 10,0  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana das linhagens dispostas no Quadro 1, para cada placa. As concentrações subsequentes dos óleos foram obtidas após diluição seriada na própria placa, partindo-se da concentração inicial de 8 % (linha A) até 0,625% (linha H), pela transferência de 100  $\mu\text{L}$  do conteúdo do poço subsequente. Para poços da linha H foram dispensados 100  $\mu\text{L}$  do conteúdo de modo a igualar o volume total dos poços. As análises foram realizadas em triplicata<sup>107</sup>.

Foi realizado o controle de toxicidade do Tween 80 na concentração utilizada para emulsão, no intuito de verificar se este não apresentava atividade inibitória para a bactéria, assim como o controle do óleo para verificar sua esterilidade (óleo mais meio de cultura). Também foram realizados: como controle positivo uma suspensão bacteriana em solução salina com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland acrescida de polimixina B (antibiótico comercial com ação inibitória para o microrganismo o estudado) e como controle negativo, uma suspensão bacteriana acrescida com mais meio de cultura.

As placas foram incubadas a 36°C por 24h, com exceção da linhagem bacteriana de *Pseudomonas fluorescens* que tem seu crescimento ótimo a 30°C no mesmo período. Para revelação dos resultados foi utilizada uma solução de resazurina sódica 0,01% a qual foi adicionada (30,0 µL) em cada cavidade e as placas incubadas por mais duas horas nas respectivas temperaturas de acordo com o microrganismo.

#### **4.7.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A CBM foi obtida por meio de semeadura, em ágar Müller-Hinton, de alíquotas de 10,0 µL das diluições correspondentes a CIM e duas imediatamente anteriores, dos conteúdos dos orifícios das placas de microdiluição. Essas concentrações imediatamente superiores a CIM são suficientes para demonstrar o efeito bactericida dos produtos naturais, visto que o efeito bacteriostático foi determinado pela ausência de crescimento nos orifícios da placa de microdiluição. Após a semeadura, as placas de Petri foram incubadas a 36°C por 24h. A CBM foi considerada a menor concentração que impediu o crescimento visível das bactérias ou permitiu a formação de até 3,0 UFC. Assim, as concentrações na qual se observou a formação de mais de 3,0 UFC, foram consideradas inibitórias ao crescimento bacteriano (CBM); enquanto nas concentrações em que se observou nulidade de crescimento ou menos de 3,0 UFC, foram consideradas bactericidas<sup>109;108</sup>. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### **4.8 Avaliação citotóxica antiproliferativa**

Os ensaios citotóxicos foram realizados pelo Centro de Pesquisa de Produtos Químicos, Biológicos e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, divisão de Farmacologia e Toxicologia em parceria com o professor Drº João Ernesto de Carvalho e sob a supervisão da pesquisadora Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.

#### 4.8.1 Preparo das culturas celulares

Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas, as seguintes linhagens celulares tumorais humanas nas suas respectivas densidades de inoculação: glioma (U251:  $5,0 \times 10^4$ ), mama (MCF-7:  $6,0 \times 10^4$ ), ovário resistente (NCI-ADR:  $5,0 \times 10^4$ ), renal (786-0:  $5,0 \times 10^4$ ), pulmão (NCI-460:  $4,0 \times 10^4$ ), próstata (PC03:  $5,0 \times 10^4$ ), ovário (OVCAR03:  $7,0 \times 10^4$ ), colon (HT29:  $4,0 \times 10^4$ ) e leucemia (K562:  $6,0 \times 10^4$ ). Também foi utilizada uma linhagem não neoplásica de queratinócitos (HaCat). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco), Penicilina: Estreptomicina ( $1000 \mu\text{g/mL}$ :  $1000 \text{ UI/mL}$ ,  $1 \text{ mL/L}$ ) e à  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Em placas de 96 poços foram depositadas  $100 \mu\text{L}$  cells/poço. Após 24h para estabilização das células as mesmas foram expostas aos óleos das folhas *in natura* ou secas nas concentrações de 0,25, 2,5, 25, e  $250 \mu\text{g/mL}$  em DMSO/RPMI at  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  durante 48 h. Doxorubicina (DOXO) foi usada como controle positivo (0,025, 0,25, 2,5 e  $25 \mu\text{g/mL}$ ). A concentração final de DMSO (0,25%) não afetou a viabilidade celular. Foram semeadas células nas placas denominadas T0 (tempo zero; ou seja, antes da adição da amostra) e placas teste (após adição das amostras). Após 48h as células foram fixadas com ácido tricloroacético a 50% e o crescimento celular foi determinado pela quantificação espectrofotométrica a 540nm do conteúdo proteico celular usando sulforodamina B (SRB)<sup>112</sup>. A concentração que leva a inibição total do crescimento celular (TGI) (*total growth inhibition*) foi determinada por análise de regressão não linear usando a curva dose-resposta para cada linhagem celular no programa ORIGIN 8.0 (Origin- Lab Corporation)<sup>87; 111</sup>.

Com esse procedimento, será preparada também a placa T0 (tempo zero), que é uma placa com triplicata de suspensão celular de cada linhagem e triplicata de meio completo. Estas placas (T0 e teste) ficam incubadas por 24h.

Após a incubação, será adicionado na placa teste, triplicata de 4 concentrações das amostras-teste (0,25, 2,5, 25 e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que serão incubadas durante 48hs. No que se refere a T0, após o período de 24h, ela será levada para procedimento de leitura

(as placas teste também serão levadas para leitura, porém somente após o período de 48h estabelecido).

Para a realização da leitura das placas, seja T0 ou placa teste realizar-se-á o seguinte procedimento:

O sobrenadante das cavidades da placa será aspirado, permanecendo apenas as células aderidas, ou seja, as viáveis. Será adicionado 100 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada cavidade e as placas permaneceram por 30 minutos a 4°C em repouso. O sobrenadante será descartado, e a placa lavada em água corrente e então seca. O próximo passo será a adição de 50 mL de SRB (sulforodamina B – Sigma, USA) 0,1% diluída em ácido acético 1%.

A placa ficará em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente Conforme a figura 12 B. Após o tempo esperado, serão realizadas 5 lavagens com ácido acético 1% para retirar o excesso de corante livre, e à placa seca adicionar-se-á 100 $\mu$ L de tampão Trizma Base (10mm, pH 10,5) (Sigma, USA) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. O resultado será obtido em absorbância em 540nm.

Para realizar o procedimento de leitura de células não aderentes, ao final das 48h, o meio de cada poço da microplaca de 96 poços será cuidadosamente removido e substituído por 0,20 mL de outro meio fresco MTT (concentração final 0,5 mg/mL). As placas serão recobertas por papel alumínio e mantidas novamente a 37°C durante 4 horas.

O meio será então removido e os cristais de MTT insolúveis, formazan, serão dissolvidos com 0,20 ml de DMSO e a absorbância determinada a 540 nm, O ensaio detecta células metabolicamente ativas e a leitura é feita em espectrofotômetro a 540 em leitor de microplacas.

Serão obtidas as absorbâncias das amostras-teste, controle negativo (CN), controle positivo (CP) e branco (Br) das amostras. O Controle positivo da reação será a doxorubicina (Europharma<sup>®</sup>) nas concentrações de 0,025, 0,25, 2,5 e 25 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. A porcentagem de crescimento de cada amostra-teste será calculada em programa *Excel*

2003/2007, utilizando-se as fórmulas segundo Monks *et al*<sup>87</sup>, e associando-se com os parâmetros de efeitos citostático ou citocida.

A dose que inibe 10% do crescimento celular (TGI) foi determinada em programa para gráficos e análises de dados (*Origin* Versão 8.0). Segundo Fouche et al. 2008 os valores de TGI podem ser divididos em quatro categorias: inativo (TGI > 50µg/mL), fraca atividade (15 µg/mL < TGI < 50 µg/mL), moderada atividade (6.25 µg/mL < TGI < 15 µg/mL) e potente atividade (TGI < 6.25 µg/mL).

A partir dos resultados obtidos foi calculado o índice de seletividade (I.S.), o qual indica a seletividade da amostra entre uma linhagem neoplásica e uma normal.

Assim, o índice de seletividade corresponde à divisão entre o valor da TGI da amostra na linhagem de células normais HaCat e o valor da TGI de cada amostra na linhagens de células neoplásicas. (IS= TGI NIH/3T3 /TGI células neoplásicas)<sup>85</sup>.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Rendimento dos óleos essenciais de folhas *in natura* e folhas secas de *Cinnamomum triplinerve***

Pode-se perceber que o rendimento obtido para o óleo essencial, a partir das folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*, foi de 0,37%, apresentando um rendimento superior. Enquanto que o rendimento de (0,16%) foi obtido para óleo de folhas secas.

Esta é a primeira descrição do rendimento do óleo essencial da espécie *Cinnamomum triplinerve*, o qual pode ser considerado baixo em relação a estudos de outras espécies da família Lauraceae (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação do rendimento dos óleos essenciais de espécies de Lauraceae.

<b>Espécies</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Referência</b>
<i>Cinnamomum triplinerve</i> (folhas <i>in natura</i> )	0,37%	Presente trabalho, 2016
<i>Cinnamomum triplinerve</i> (folhas secas)	0,16%	Presente trabalho, 2016
<i>Cinnamomum burmannii</i> (folhas)	1,01%	Kuspradini et al <sup>113</sup>
<i>Endlicheria citriodora</i> (folhas)	4,29%	Klenicy et al <sup>114</sup>
<i>Endlicheria citriodora</i> (galhos)	2,25%	Klenicy et al <sup>114</sup>
<i>Rhodostemonodapne parvifolia</i> (folhas)	0,07%	Alcântara et al <sup>4</sup>
<i>Rhodostemonodapne parvifolia</i> (caule)	0,01%	Alcântara et al <sup>4</sup>
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (folhas)	0,40%	Lima et al <sup>13</sup>
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (galhos)	0,30%	Lima et al <sup>13</sup>

Variações no rendimento dos óleos, assim como oscilações em sua composição podem ocorrer por diversas condições tais como: sazonalidade, horário de colheita do vegetal, condições bioquímicas e fisiológicas intraplanta. Além desses fatores é necessário considerar o ciclo circadiano, disponibilidade de água e nutrientes para o bom desenvolvimento do vegetal<sup>14</sup>.

Os óleos de folhas *in natura* e seca da *Cinnamomum triplinerve*, demonstraram-se promissores pelos seus principais constituintes químicos, havendo necessidade de mais estudos, inclusive filogenéticos, envolvendo outras procedências, e mais variáveis, para explicar a variabilidade no rendimento do óleo essencial<sup>115</sup>.

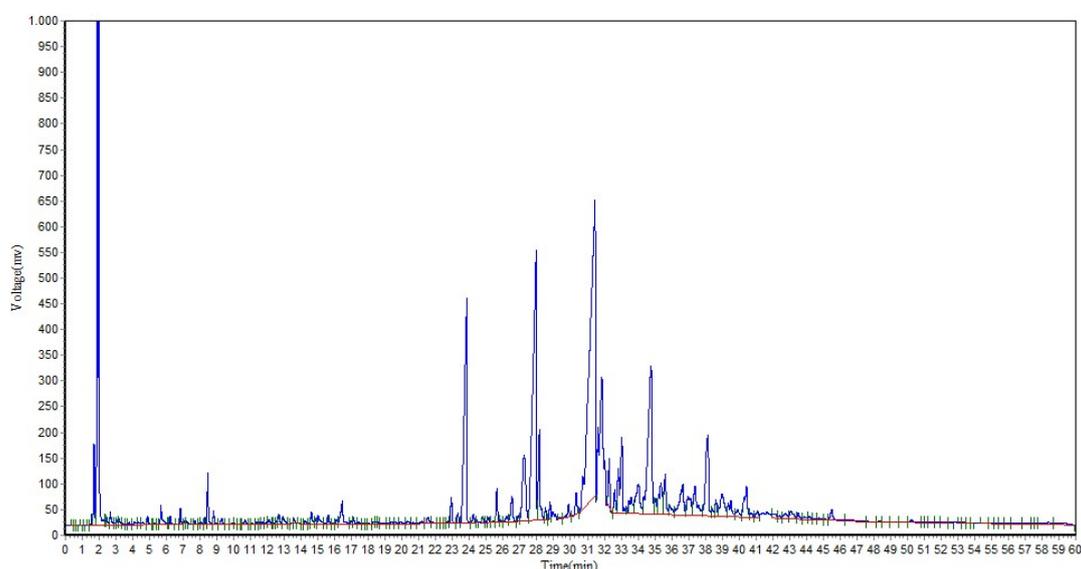
## 5.2 Identificação da composição química do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum triplinerve*

### 5.2.1 Composição química do óleo das folhas *in natura* por CG-DIC

A análise por cromatografia em fase gasosa com detectores de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM), possibilitou a comparação do perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum triplinerve* e de sua composição química.

Pode-se observar que alguns compostos sobressaíram-se nas análises de CG-DIC, demonstrando a presença majoritária de quatro compostos, sendo o cariofileno e o nerolidol os que se destacam, identificado pelos seus respectivos índices e comparados com a literatura Adams<sup>105</sup> e biblioteca Nist do programa de CG-EM. Conforme a Figura 7 a seguir.

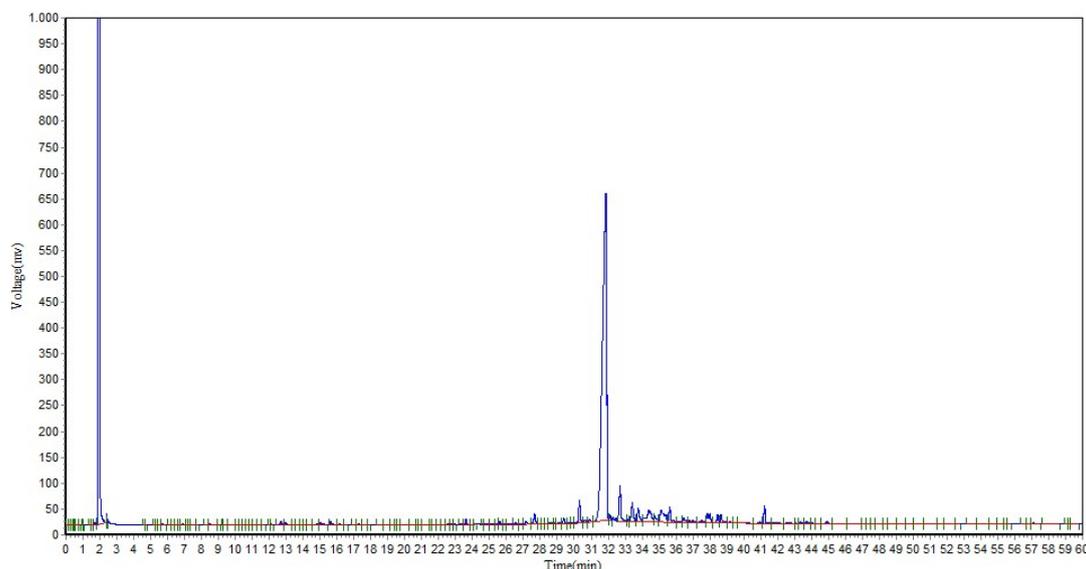
**Figura 7.** Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*.



### 5.2.2 Composição química do óleo das folhas secas (CG-DIC)

A análise de CG-DIC apresenta os compostos com seus tempos de retenção e abundância bastante semelhante aos de CG-EM, tendo como majoritário o composto sesquiterpeno espatulenol com 83,73% de abundância, conforme a Figura 8.

**Figura 8.** Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial de folhas secas de *Cinnamomum triplinerve*.



### 5.2.3 Composição química do óleo das folhas *in natura* por CG-EM

Vinte e nove compostos voláteis foram identificados para o óleo de folhas *in natura* da *Cinnamomum triplinerve* com base nos seus espectros de massas, comparados com os da literatura e com a biblioteca eletrônica, e com seus índices de retenção, obtidos por comparação de tempos de retenção com hidrocarbonetos lineares (Tabela 2).

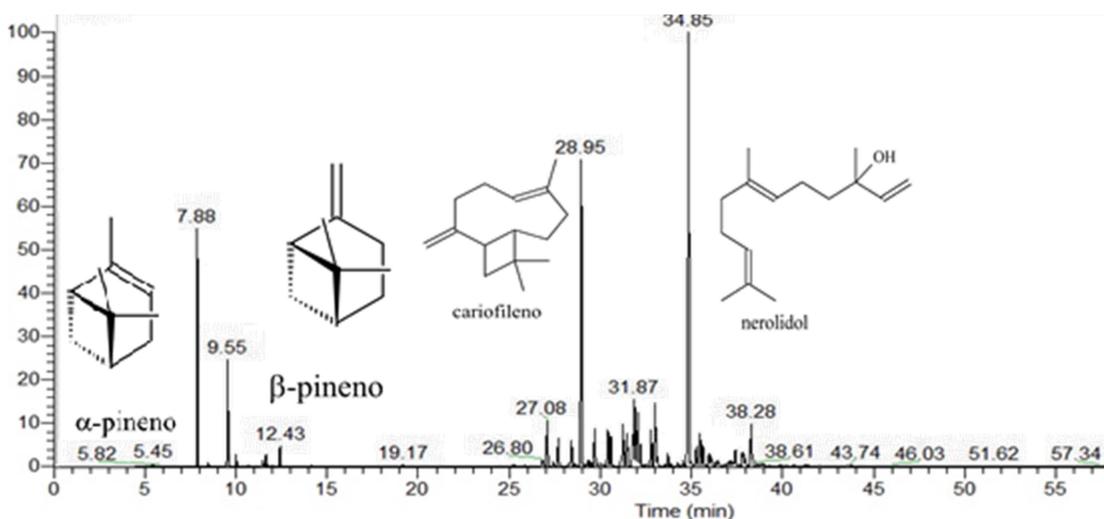
A análise química de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) possibilitou a identificação de monoterpenos e sesquiterpenos na composição dos óleos essenciais.

A maior diversidade de compostos se deve a classe dos sesquiterpenos, com predominância dos compostos cariofileno e nerolidol nas amostras das folhas *in natura* representado nas respectivas fórmulas estruturais, para monoterpenos,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno foram os principais constituintes químicos observados (Figura 14). Foram identificados os compostos voláteis com base nos espectros de massas, comparados à literatura Adams e índices de retenção<sup>105</sup>.

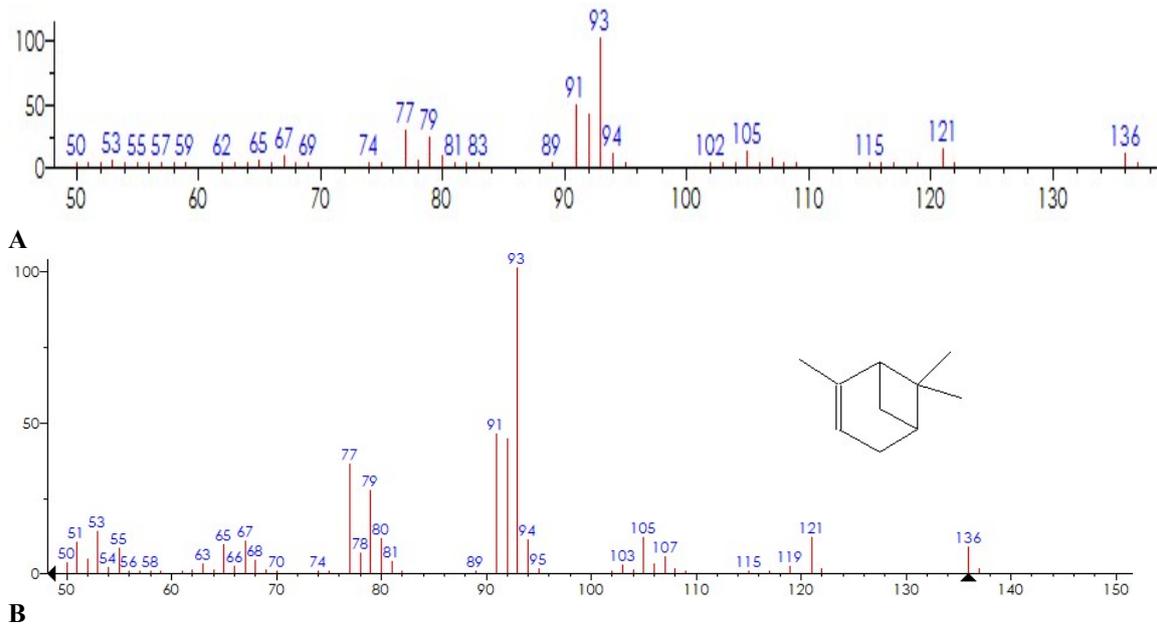
Conforme o cromatograma do óleo, apresentado na Figura 9, foi possível observar a diferença de composição no perfil cromatográfico. Os compostos majoritários monoterpênicos foram encontrados com tempo de retenção de aproximadamente 7,88 e 9,55, atribuídos como os monoterpênicos  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, sendo representado em percentual de 13,50% e 6,04% respectivamente, enquanto que os compostos majoritários da classe dos sesquiterpenos tiveram seu tempo de retenção 28,95 e 38,85 e abundância de 17,38% e 24,56% respectivamente.

As Figuras 10 a 13 mostram e exemplificam os espectros de massa dos compostos analisados, onde foram observados os respectivos picos em comparação com os espectros da biblioteca. Desta maneira e com a obtenção dos índices de retenção, atribuiu-se a identidade de cada composto.

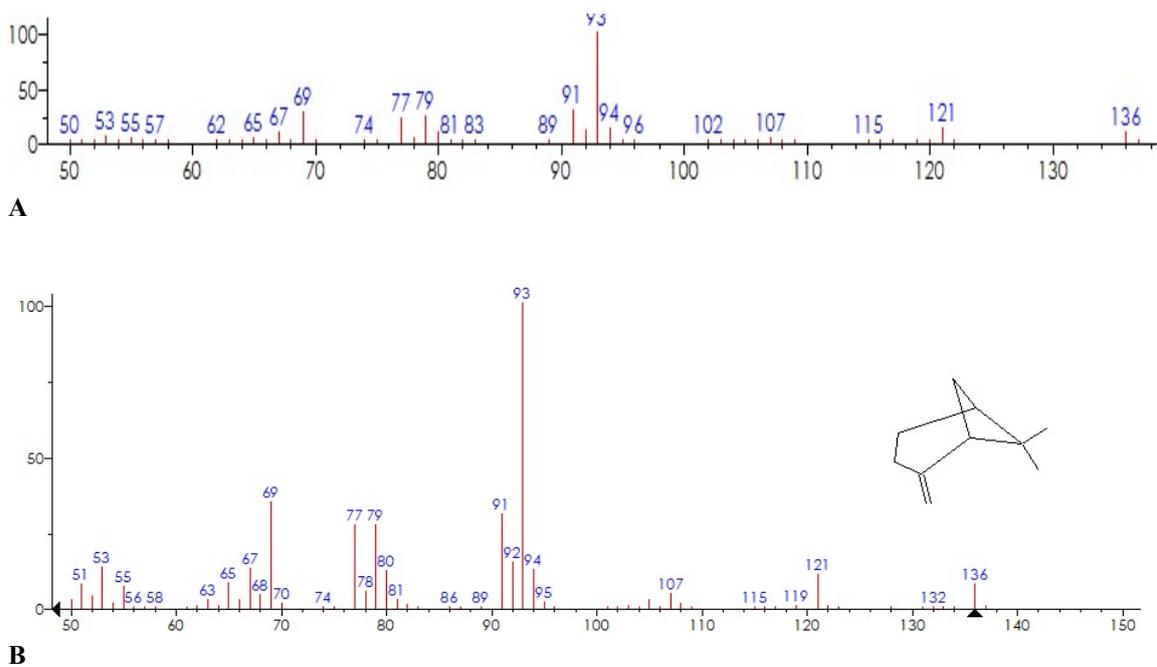
**Figura 9.** Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*, obtido por CG-EM.



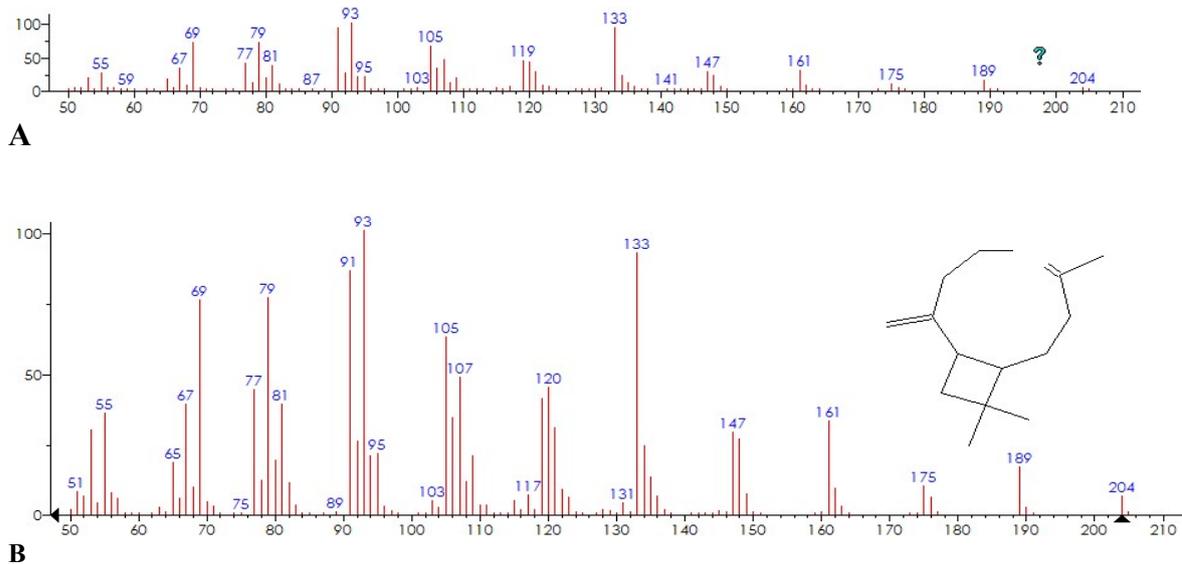
**Figura 10.** Espectros comparativos entre a amostra do composto monoterpene,  $\alpha$ -pineno, presente no óleo de folhas *in natura* (A) e o espectro da literatura NIST (B).



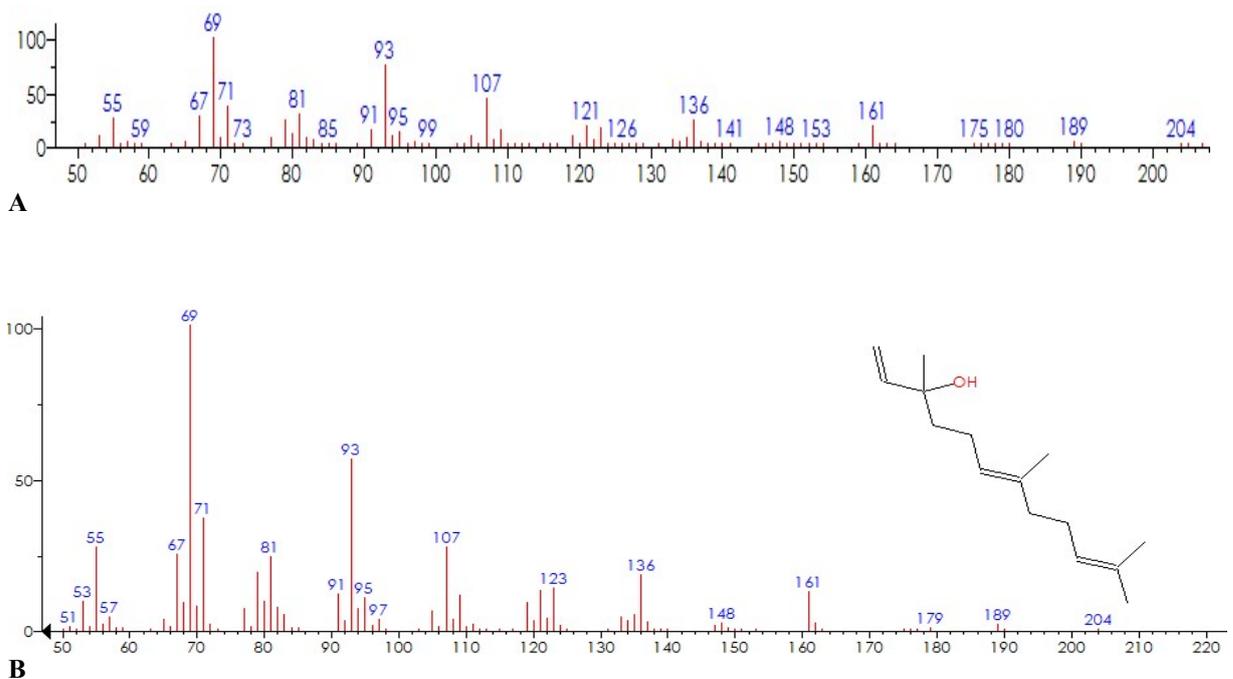
**Figura 11.** Espectros comparativos entre a amostra do composto monoterpene,  $\beta$ -pineno, presente no óleo de folhas *in natura* (A) e o espectro da literatura NIST (B).



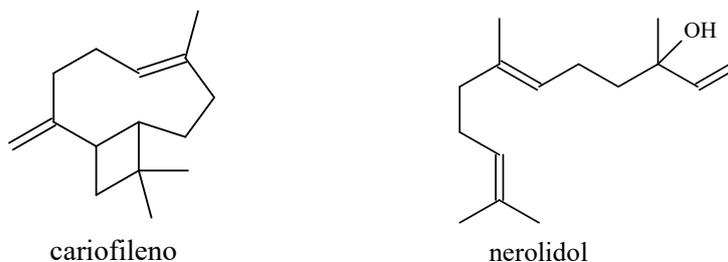
**Figura 12.** Espectros comparativos entre a amostra do composto sesquiterpeno, cariofileno, presente no óleo de folhas *in natura* (A) e o espectro da literatura NIST (B).



**Figura 13.** Espectros comparativos entre a amostra do composto sesquiterpeno, nerolidol, presente no óleo de folhas *in natura* (A) e o espectro da literatura NIST (B).



**Figura 14.** Estrutura dos principais compostos identificados no óleo de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*.



O óleo essencial de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve* apresentou informações qualitativas e quantitativas, obtidas pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Foram identificados 29 compostos dos constituintes como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Relação dos compostos identificados a partir de análise cromatográfica do óleo essencial de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve* obtido por CG-EM.

	Composto	Abundância %	TRa	IKc	Adams
1	<b><math>\alpha</math>-Pineno</b>	<b>13,50</b>	<b>7,88</b>	<b>927</b>	<b>932</b>
2	<b><math>\beta</math>-Pineno</b>	<b>6,04</b>	<b>9,55</b>	<b>973</b>	<b>979</b>
3	$\beta$ -Mirceno	0,69	10,01	986	988
4	Cimeno <p>	0,01	11,48	1022	1022
5	D-limoneno	0,71	11,66	1031	1024
6	Ocimeno (Z)	0,01	11,98	1033	1032
7	$\beta$ -ocimeno (E)	1,18	12,43	1044	1044
8	Copaeno	2,63	27,08	1371	1374
9	$\beta$ -bourboneno	0,28	27,40	1379	1387
10	$\beta$ -elemeno	1,60	27,70	1385	1389
11	$\alpha$ -gurjuneno	1,50	28,40	1402	1409
12	<b>Cariofileno</b>	<b>17,38</b>	<b>28,95</b>	<b>1415</b>	<b>1417</b>
13	$\alpha$ -humuleno	2,07	30,41	1450	1452
14	Allo-aromadendreno	0,01	30,59	1455	1458
15	$\tau$ -muuruleno	2,41	31,25	1471	1478
16	Germacreno-D	1,87	31,47	1476	1484
17	Viridiflorene	3,81	31,87	1486	1496
18	$\beta$ -guaiano (cis)	0,01	32,06	1490	1490
19	$\alpha$ -muuruleno	0,01	32,21	1494	1499

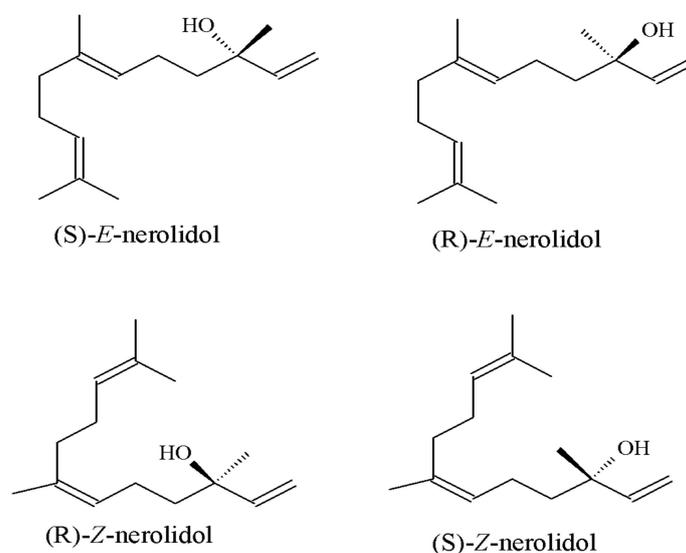
20	$\tau$ -cadineno	2,06	32,78	1508	N
21	$\gamma$ -cadineno	3,58	33,00	1514	1513
22	Ocidentalol	0,18	34,23	1545	1548
23	<b>Nerolidol</b>	<b>24,56</b>	<b>34,85</b>	<b>1561</b>	<b>1561</b>
24	Espatulenol	0,01	35,27	1572	1577
25	Epoxido-cariofileno	1,85	35,45	1576	N
26	Globulol	0,71	35,62	1580	1590
27	Ledol	0,71	35,95	1589	1602
28	$\tau$ -cadinol	0,01	37,78	1637	1638
29	$\alpha$ -cadinol	2,39	38,28	1651	1651

TRa : tempo de retenção da amostra /IKc: índice de Kovats calculado/ Adams: Literatura de comparação/ N: Não encontrado

### 5.2.3.1 Isômeros do sesquiterpeno nerolidol

O sesquiterpeno nerolidol pode ser biosintetizado naturalmente nas suas quatro formas isoméricas (Figura 15). No óleo de *Cinnamomum triplinerve* este sesquiterpeno, que representa 24,56 % da composição do óleo das folhas *in natura*, teve sua configuração (E-nerolidol) determinada. Foi identificado através de índices de retenção (1561) e por CG-EM. Através destes dados podemos atribuir que o sesquiterpeno apresentado, trata-se do isômero E-nerolidol.

Figura 15. Isômeros do nerolidol

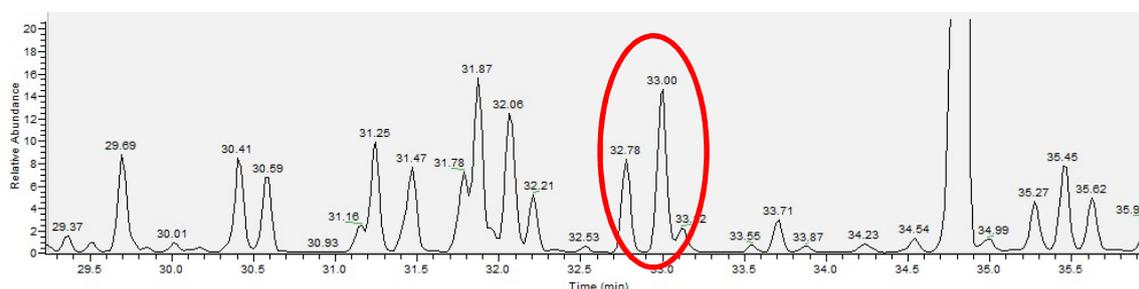


### 5.2.3.2 Isômeros do sesquiterpeno cadineno

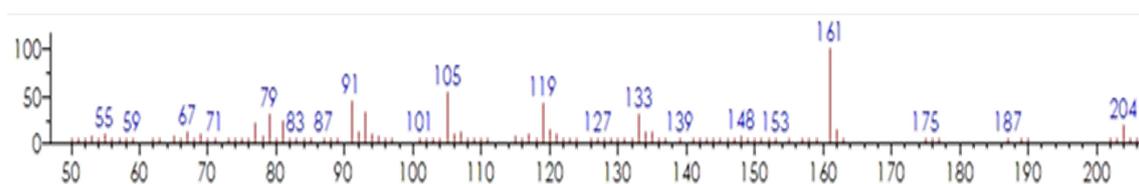
O exemplo a seguir demonstra a utilidade dos dados relacionados aos índices de retenção. Pode-se verificar a aplicabilidade, os quais são importantes para definir a real estrutura dos sesquiterpenos que apresentam o esqueleto carbônico cadineno.

No cromatograma da Figura 16, observa-se que os compostos com tempo de retenção 32,78 minutos e 33,00 minutos tratam-se de sesquiterpenos com esqueleto derivado do cadineno. Esta observação é baseada nos dados de espectrometria de massas dos compostos conforme demonstrado na Figura 17 e 18 A e B respectivamente, e por pesquisa e comparação com dados da NIST (biblioteca de espectros).

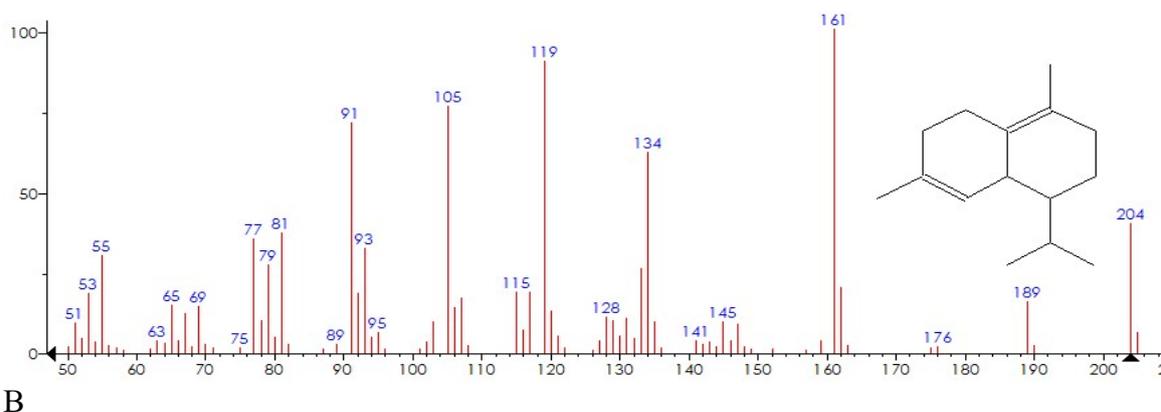
**Figura 16.** Cromatograma representando os compostos  $\tau$ -cadineno 2,06% com tempo de retenção 32,78 e o  $\gamma$ -cadineno 3,58% com tempo de retenção 33,00.



**Figura 17.** Espectros comparativos entre a amostra do composto  $\tau$ -cadineno presentes no óleo de folhas *in natura* (A) e o espectro da literatura NIST.

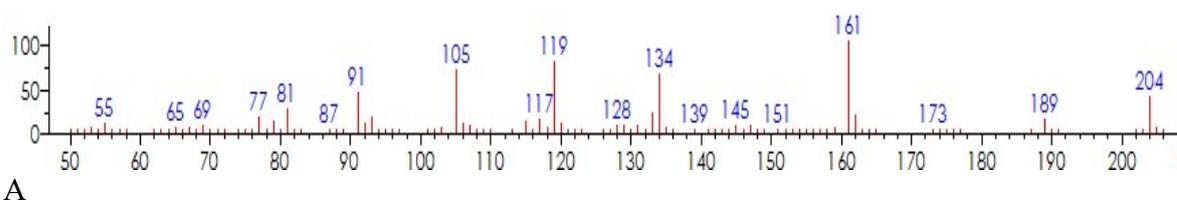


A

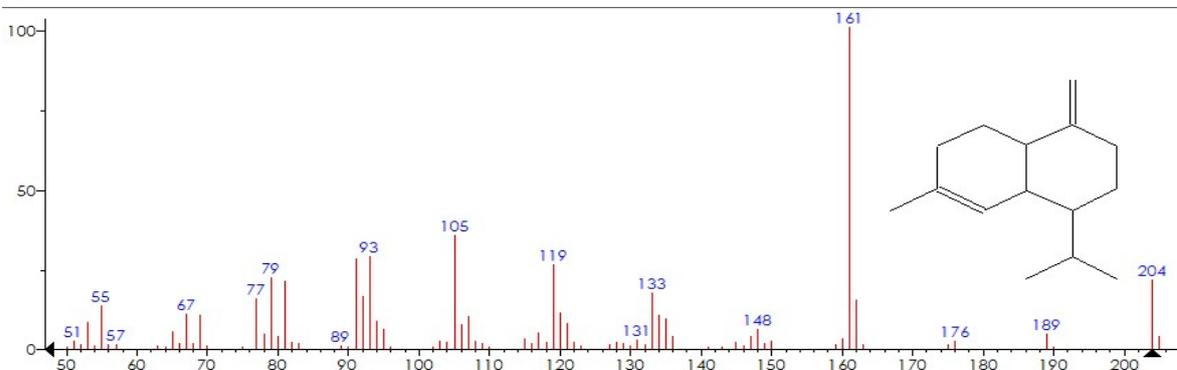


B

**Figura 18.** Espectros comparativos entre a amostra do composto  $\gamma$ -cadineno presentes no óleo de folhas *in natura* (A) e o espectro da literatura NIST.



A



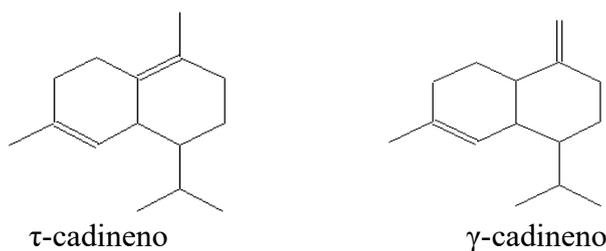
B

Existem vários compostos que apresentam esqueleto básico, como o cadineno e consequentemente grande similaridade nos seus espectros de massas, não sendo possível atribuir a identidade do composto baseado somente nesse espectro de massa. A dificuldade aumenta quanto se trata de isômeros, como é o caso dos cadinenos aqui estudados.

Assim, a informação que foi decisiva para atribuir a qual dos isômeros do cadineno se referia os picos (32,78 e 33,00 minutos) foi baseada nos seus índices de retenção. Foi verificado um índice de retenção de 1508 para o composto com tempo de

retenção de 32,78 e 1514 para o composto com tempo de retenção de 33,00 minutos. Desta forma, baseados nos índices de retenção, foram identificados os compostos  $\tau$ -cadineno e  $\gamma$ -cadineno, presentes na amostra, demonstrando que os índices de retenção podem ser decisivos na indicação de compostos isoméricos presentes em óleos essenciais (Figura 19).

**Figura 19.** Estruturas dos sesquiterpenos  $\tau$ -cadineno 2,06% e  $\gamma$ -cadineno 3,58%

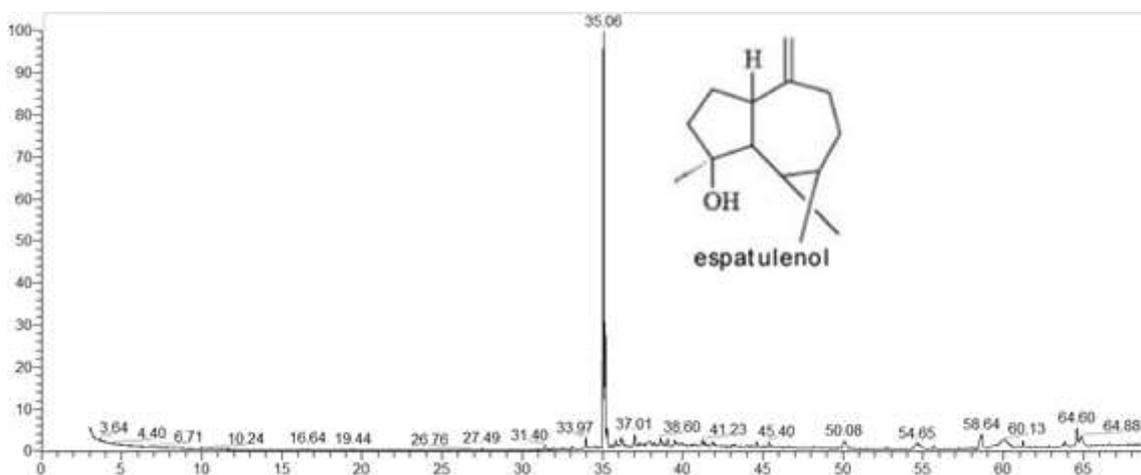


#### 5.2.4 Composição química do óleo das folhas secas (CG-EM)

Foram identificados três compostos em CG-EM para o óleo de folhas secas da *Cinnamomum triplinerve* com base nos seus espectros de massas, em comparação aos da literatura e com Biblioteca eletrônica do equipamento de espectroscopia de massas e seus índices de retenção que foram calculados, obtidos por comparação de tempos de retenção com hidrocarbonetos lineares.

Sendo que o espatulenol, de acordo com as Figuras 20 e 21 A e B foi o composto majoritário com abundância de 83,73% (Tabela 3).

**Figura 20.** Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas secas de *Cinnamomum triplinerve* obtido por CG-EM.



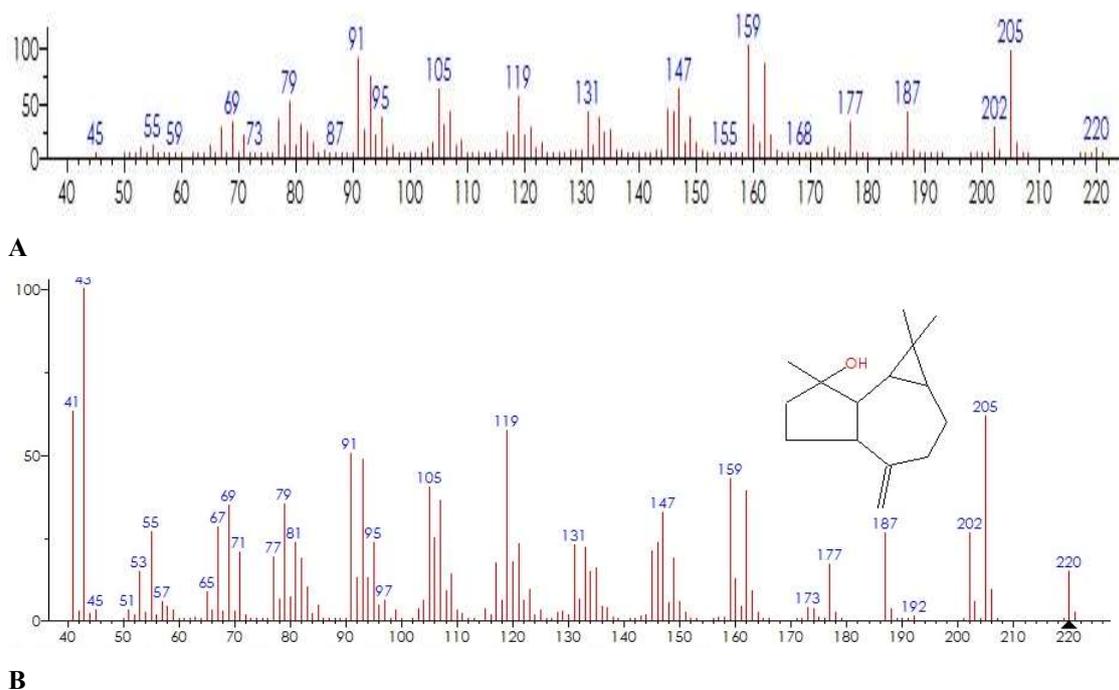
O interesse no óleo de folhas secas se deve ao fato de apresentar o alto teor (73%) de spatulenol sendo observada sua estrutura na Figura 22, como componente majoritário, o que dificilmente é encontrado em outros óleos, nos quais o teor deste sesquiterpeno é menor como apresentado no óleo essencial de folhas *in natura* (0,01%). Alguns picos com baixa abundância referem-se ao restante da composição, e não foram analisados.

**Tabela 3.** Lista dos compostos obtidos a partir de análise cromatográfica do óleo essencial de folhas secas de *Cinnamomum triplinerve* obtido por CG-EM.

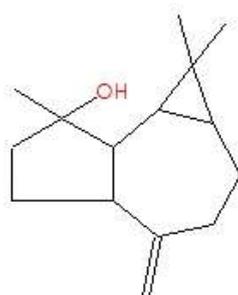
Composto	Abundância	TRA	IKC	Adams <sup>105</sup>
	%			
1 Espatulenol	83,73	34,06	1566	1577
2 Óxido de cariofileno	3,5	35,16	1569	1582
3 Verbenol (cis)	0,17	16,64	1143	1140

Compostos listados por ordem de eluição em coluna DB5 por CG-MS

**Figura 21.** Espectros comparativos entre a amostra do óleo essencial das folhas secas (A) e o banco de dados da Literatura NIST (B), referente ao composto sesquiterpeno oxigenado espatulenol.



**Figura 22.** Estrutura do principal compostos identificado no óleo de folhas secas de *Cinnamomum triplinerve* com abundância de 83,73%



Espatulenol

### 5.3 Resultados da triagem antibacteriana do óleo essencial de *Cinnamomum triplinerve*.

A triagem antibacteriana inicia-se com a técnica de bioautografia direta obtendo preliminarmente a sensibilidade dos óleos de *Cinnamomum triplinerve*, tanto para folhas *in natura* quanto para folhas secas.

### 5.3.1 Bioautografia direta do óleo essencial de folhas *in natura*

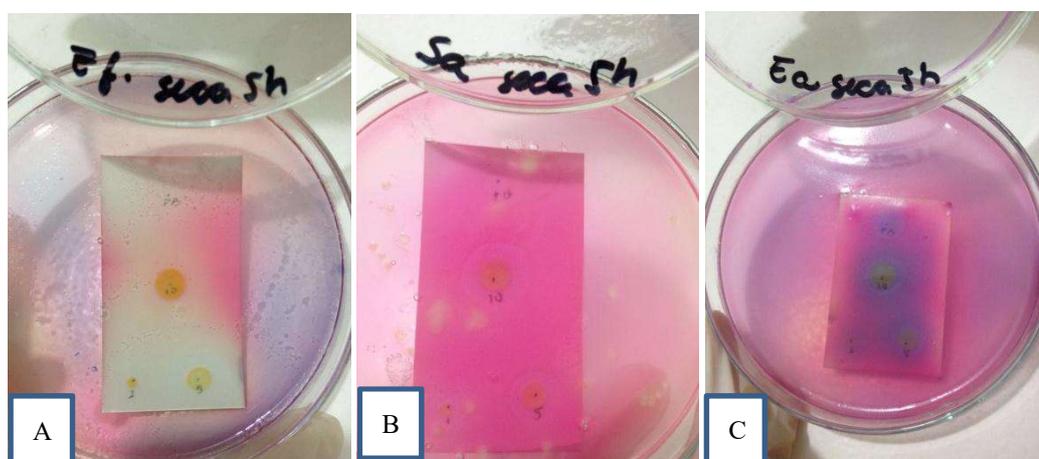
O ensaio com óleo de folhas *in natura* apresentou pouca difusão pelo ágar, sendo assim pode ter sido a razão pela qual os resultados obtidos desse óleo não apresentaram atividade antimicrobiana para esta técnica.

### 5.3.2 Bioautografia direta do óleo essencial de folhas secas

O critério utilizado para interpretação dos resultados foi o aparecimento de zonas claras em torno das substâncias aplicadas na cromatoplaça de camada delgada (CCD), indicando a respectiva atividade antimicrobiana <sup>116;74</sup>.

As análises bioautográficas do óleo de folhas secas apresentaram-se com resultados consideráveis sensíveis (Ativos) na presença de 5 µL de óleo para as seguintes linhagens bacterianas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacter aerogenes* evidenciado, enquanto que para as linhagens bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* foi considerado resistente (Figura 23).

**Figura 23.** Resultados de bioautografia direta com formação de halos de inibição. A) *Enterococcus faecalis*; B) *Staphylococcus aureus*; C) *Enterobacter aerogenes*.



## 5.4 Disco de difusão

### 5.4.1 Disco de difusão em ágar (halo de inibição) folhas *in natura*

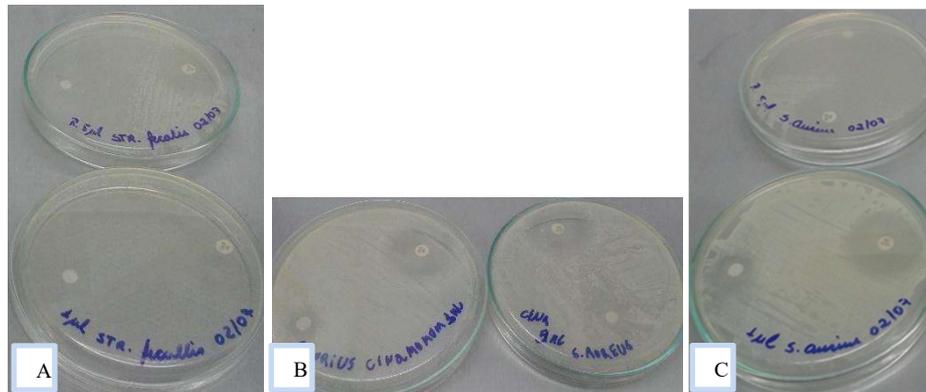
Realizou-se análise do óleo de folhas *in natura* por difusão em ágar na concentração de 1µL e 5 µL para verificar a melhor eficiência de ação antibacteriana do óleo. Pode-se observar que com 5 µL a ação foi maior para as linhagens gram-positiva de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* conforme as Figuras 23 A, B e C), e para as gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, sendo considerado sensível apresentando halo de inibição maior que 10mm de diâmetro considerando o disco <sup>117</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4.** Atividade antibacteriana do óleo essencial da folha *in natura* de *Cinnamomum triplinerve* através de difusão em ágar (halo de inibição mm).

Cepas bacterianas	Gram	Halo de inibição mm	Padrão cloranfenicol	Interpretação
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	0	27,26	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	12,6 +/- 0,37	29,52	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	14,6 +/- 0,53	24,65	S
<i>Escherichia coli</i>	-	7,4 +/- 0,47	30,45	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	0	26,37	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	10,3 +/-0,46	12,39	S
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	15,2 +/- 0,24	30,44	S

S- sensível / R- resistente n=3

**Figura 24.** Halo de inibição na concentração 5  $\mu$ L A) *Enterococcus faecalis* B) *Pseudomonas fluorescens* C) *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Arquivo pessoal (2015)

#### 5.4.2 Disco de difusão em ágar (halo de inibição) folhas secas

Para as análises realizadas com o óleo das folhas secas de *Cinnamomum triplinerve* (Tabela 5) apresentada a seguir, que o óleo apresentou-se sensível para as bactérias gram- positivas *Staphylococcus aureus* (Figura 25 A) e *Enterococcus faecalis* (Figura 25 B) confirmando a análise com a folha *in natura*, porém apresentou resistência para a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, provavelmente devido aos seus compostos ou a composição sinérgica de todos eles. Apresentou resistência maioria das linhagens analisadas como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* que não apresentaram nenhum halo de inibição.

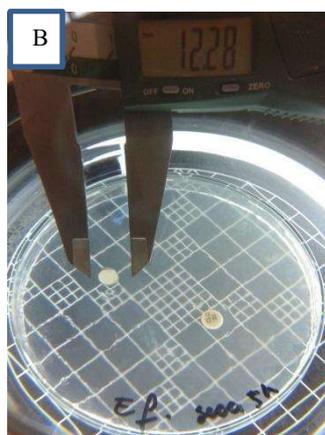
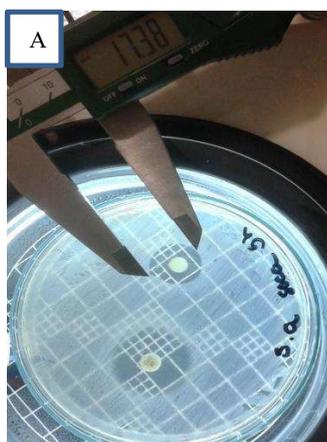
Porém, *Pseudomonas fluorescens* e *Enterobacter aerogenes* apresentaram um halo de inibição em torno de 8 mm. Entretanto neste trabalho foi considerado ativo somente aquelas em que o houve a presença de halo de inibição a cima de 10mm (Figura 25 C e D).

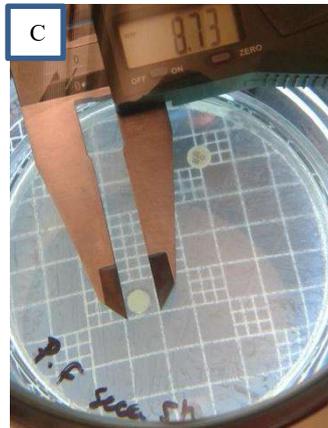
**Tabela 5.** Resultado de atividade antibacteriana do óleo essencial da folha seca de *Cinnamomum triplinerve* através de difusão em ágar (halo de inibição mm).

Cepas bacterianas	Gram	Halo de inibição Mm	Padrão cloranfenicol Mm	Interpretação
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	8,7 +/- 0,30	27,01	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	12,5 +/- 0,21	28,36	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	16,2 +/- 0,19	22,39	S
<i>Escherichia coli</i>	-	0	27,02	R
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	0	28,00	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	0	15,20	R
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	8,1 +/- 0,46	30,44	R

S- sensível R- resistente n=3

**Figura 25.** Halo de inibição pelo método de difusão em ágar em concentração de 5 µL A) *Staphylococcus aureus* B) *Enterococcus faecalis* C) *Pseudomonas fluorescens* D) *Enterobacter aerogenes*.





Fonte: Arquivo pessoal (2016)

### 5.4.3 Atividade de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de folhas *in natura*

Estudos mostram que os óleos essenciais apresentam efeito bactericida e bacteriostático contra diferentes espécies de bactérias<sup>117; 6; 108</sup>. Entretanto, não há relatos quanto à ação de óleos essenciais de *Cinnamomum triplinerve*, sendo este um trabalho inédito frente às bactérias *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*.

A concentração inibitória mínima foi confirmada como positiva para o último orifício que apresentou coloração azul, indicando ausência de crescimento visível, em contrapartida, os orifícios que apresentaram coloração rosa indica a presença de células viáveis.

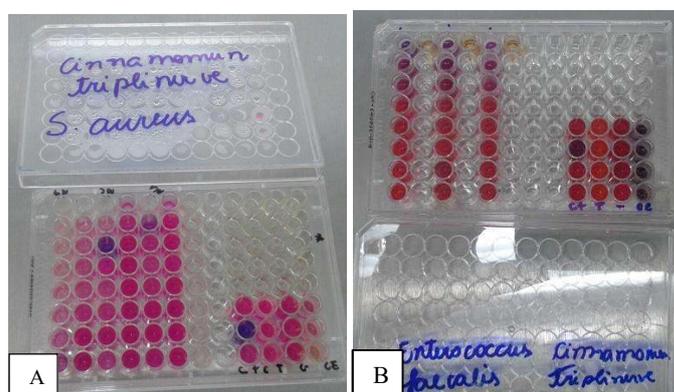
Os valores de CIM analisados demonstraram que o óleo da *Cinnamomum triplinerve* apresenta propriedades biológicas ativas frente à duas linhagens bacterianas das sete analisadas, sendo elas as *Staphylococcus aureus* e a *Enterococcus faecalis* (Figura 26). Os produtos naturais apresentam atividade antimicrobiana adequada quando sua concentração inibitória é inferior a  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ <sup>53</sup>. A CIM do óleo essencial das folhas *in natura* da *C. triplinerve* apresentou atividade de 4% correspondente a 36,0

mg mL<sup>-1</sup>, indicando que para inibir o crescimento do microrganismo analisado (*Staphylococcus aureus*) foi necessário 4% de amostra de óleo, correspondendo a 36,0 mg mL<sup>-1</sup> e para *Enterococcus faecalis* foi necessário uma concentração de 8% de óleo correspondendo a 72,0 mg mL<sup>-1</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados de atividade antibacteriana (MIC) do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*.

Cepas bacterianas	Óleo essencial mg mL <sup>-1</sup>	Óleo essencial %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Escherichia coli</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Enterococcus faecalis</i>	72,0	8,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	36,0	4,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sem ação	Sem ação

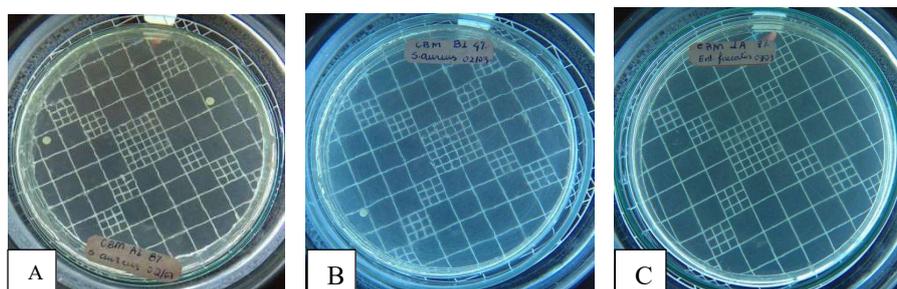
**Figura 26.** Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve* pelo método de Microdiluição em placas de 96 poços A – *Staphylococcus aureus* e B - *Enterococcus faecalis*.



#### 5.4.4 Atividade da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de folhas *in natura*

Conforme análise apresentada para concentração inibitória mínima CIM, foi verificada a concentração bactericida mínima CBM, sendo que a mesma foi considerada tanto bacteriostática quanto bactericida para as linhagens de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* sendo considerada atividade bactericida abaixo de 3,0 UFC (Figura 27). Em contrapartida as linhagens de *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Enterobacter aerogenes* apresentaram-se resistente ao óleo indo de encontro com os resultados de CIM.

**Figura 27.** Concentração Bactericida Mínima frente à *Staphylococcus aureus* e a *Enterococcus faecalis* de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*.



#### 5.4.5 Atividade da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de folhas secas

A ação do óleo de folhas secas apresentou uma atividade inibitória considerável sendo 2,25 mg mL<sup>-1</sup> em relação as bactérias, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, uma vez que o limite estabelecido pela literatura é de até 100 mg ml<sup>-1</sup> <sup>53</sup>, sendo necessário somente 0,25% do óleo essencial para inibir o crescimento desses microrganismos (Figura 28). Este resultado é importante principalmente para *S. aureus* devido ao grande aumento da resistência de bactérias, em âmbito mundial (Tabela 7).

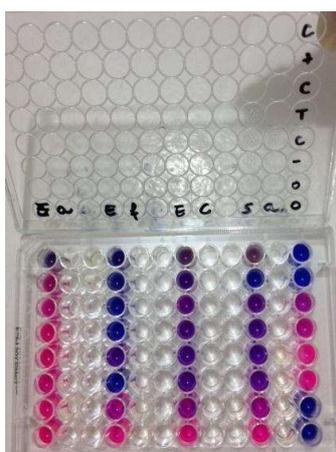
Considerando a atividade inibitória do óleo essencial de folhas secas do crescimento microbiano pode-se sugerir que tal atividade está relacionada à elevada

concentração de espatulenol (83,73%). Conforme relatos da literatura estão descritas atividades revelando múltiplas atividades biológicas, tais como inseticida, citotóxica e antimicrobiana <sup>39</sup>.

**Tabela 7.** Atividade antibacteriana (CIM) do óleo essencial das folhas secas de *Cinnamomum triplinerve*.

Cepas bacterianas	Óleo essencial mg mL <sup>-1</sup>	Óleo essencial %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Escherichia coli</i>	2,25	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,25	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,25	0,25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sem ação	Sem ação
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sem ação	Sem ação

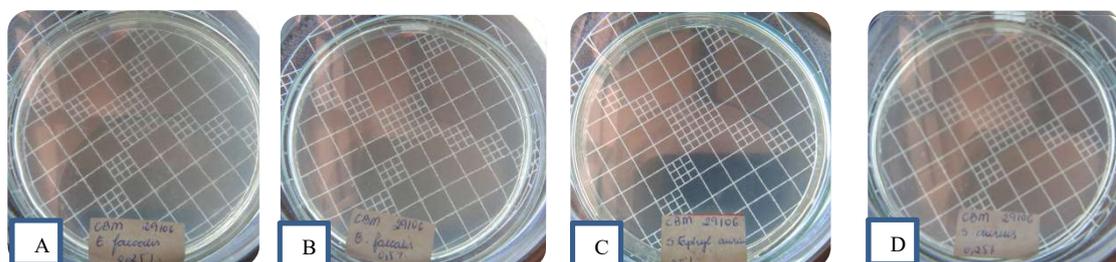
**Figura 28.** Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas secas de *Cinnamomum triplinerve* pelo método de Microdiluição em placas de 96 poços. Da esquerda para direita *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus*.



#### 5.4.6 Atividade da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de folhas secas

A Concentração Bactericida Mínima, foi de encontro com a com a CIM sendo então bactericida para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* com 2,25 mg ml<sup>-1</sup> e com apenas 0,25% de óleo essencial sendo considerado bactericida para ambos os microrganismos gram-positivos. As demais linhagens bacterianas formaram mais de 3,0 UFC o que não caracterizou atividade bactericida, como é o caso da *Escherichia coli*, que apresentou CIM, porém, não apresentou atividade para CBM, ou seja, foi considerada bacteriostática para *Escherichia coli*, porém não bactericida (Figura 29).

**Figura 29.** Concentração Bactericida Mínima frente à *Staphylococcus aureus* e a *Enterococcus faecalis* de folhas secas.



Fazendo um comparativo dos resultados apresentados para atividade antibacteriana pode-se observar que dentre as técnicas de triagem analisadas preliminarmente o ensaio de difusão em ágar apresentou o melhor resultado se comparado com a biotografia direta, já que houve inibição do crescimento, halos acima de 10,0 mm de diâmetro<sup>106;110</sup> mostrando-se sensível para *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, ambas gram negativas e também para *Pseudomonas aeruginosa*, sendo esta uma gram-positiva entre as linhagens de bactérias testadas.

Embora essa tenha sido a técnica com maior quantidade de microrganismos sensíveis, pode-se considerar que o método de microdiluição em caldo confirmou a atividade antimicrobiana, para as linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, o que demonstra uma maior resistência das gram-negativas provavelmente

devido a sua camada lipohidrofóbica, pois a alteração da permeabilidade da membrana e das paredes celulares das bactérias se deve ao caráter lipofílico dos óleos essenciais que se acumulam nas membranas, bactérias gram-negativas, possuem membrana externa rica em lipopolissacarídeos, formando uma superfície hidrofóbica.

Esse caráter cria uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas com os óleos essenciais, sendo uma provável explicação para a resistência das bactérias gram-negativas aos óleos essenciais<sup>12</sup>.

Estudos como o de Gelinski et al<sup>32</sup> relataram que o nerolidol não inibiu o crescimento de algumas bacterias gram-negativas como, *Escherichia coli*. Porém, houve sensibilidade para bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*. O que provavelmente tenha ocorrido com a ação do óleo essencial de *Cinnamomum triplinerve* através da composição do nerolidol (24,5%) como sendo um sesquiterpeno majoritário, contribuindo com a atividade em relação à *Staphylococcus aureus*.

O  $\beta$ - cariofileno é um isômero que apresenta atividades biológicas entre elas: anticarcinogênicas, antioxidantes, antibacteriana conforme estudos realizados<sup>21; 23; 89</sup>. Pode-se então compreender que o óleo essencial de *Cinnamomum triplinerve* possui potencial farmacológico devido à concentração expressiva do mesmo (17,38%), na composição química de *Cinnamomum triplienerve in natura*.

O óleo essencial de folhas secas de *Cinnamomum triplinerve* tem como o composto majoritário o espatulenol, encontrado principalmente nos indivíduos *Ocotea nectandrifolia* pertencente à família Lauraceae assim como neste estudo em *Cinnamomum triplinerve* pode estar relacionado à atividade antimicrobiana.

Levando em consideração que fatores extrínsecos como temperatura, umidade e caracteírticas do solo, podem influenciar na composição química desses óleos, a atividade biológica mais intensa pode ser confirmada por este fato, uma vez que ao estar diretamente ligada ao tronco os metabólitos secundários devido ao estresse sofrido podem ter intensificado os compostos, principalmente o espatulenol com abundância de 83%.

### 5.4.7 Atividades antiproliferativa e citotóxica do óleo essencial de folhas *in natura*.

Conforme a Tabela 8 o óleo essencial de folhas *in natura* da espécie *Cinnamomum triplinerve* apresentou fraca atividade em 5 linhagens testadas e foi inativo nas demais adotando-se o critério proposto por Fouche *et al* (2008)<sup>119</sup>.

A partir das atividades antimicrobianas encontradas para os óleos essenciais de folhas *in natura*, foi importante conhecer a citotoxicidade frente a células normais, onde foi constatado um valor de TGI igual a 62µg/mL, não apresentando assim toxicidade para células normais e indicando potencial uso em testes clínicos.

O resultado em células HaCat (62 µg/mL) também permitiu o cálculo do índice de seletividade em relação a linhagem de células leucêmicas, que embora com fraca atividade 27,5 µg/mL, nesta última, mostra que o óleo foi 2,3 vezes mais seletivo para linhagem neoplásica.

**Tabela 8.** TGI (µg mL<sup>-1</sup>) – Resultados de atividade antineoplásica e citotóxica do óleo essencial de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve*.

	2	M	A	7	4	P	O	H	K	Q
<b>Doxo</b>	0,83	9,8	>25	13,1	12,9	4,9	5,5	>25	3,4	9,1
<b><i>Cinnamomum triplinerve</i></b> <b>(In Natura)</b>	<b>40,5</b>	57,4	68,6	<b>45,2</b>	61,7	<b>45,6</b>	<b>50,6</b>	52,5	<b>27,5</b>	62

Linhagens tumorais humanas: 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/res (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI (pulmão); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03(ovário); h= HT29(cólon); k =K562 (leucemia). Linhagem não tumoral humana: q = HaCat (queratinócitos imortalizados). TGI = concentração (em µg/mL) necessária para inibir totalmente a proliferação celular.

A presença de alguma atividade em especial frente a células leucêmicas provavelmente pode estar relacionada ao composto nerolidol presente e maior abundância no óleo de folhas *in natura*. Uma relação entre composição química e atividade antiproliferativa é evidente, pois o hidrocarboneto terpênico nerolidol é considerado um agente antiproliferativo. A sua evidência na composição poderia manter a atividade para a maioria das células, porém, promoveu propriedades específicas para células leucêmicas K 562. Entretanto, Houghton *et al*<sup>87</sup> descreveram que pela análise

dos constituintes químicos dos óleos essenciais não é possível afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica em estudo. Assim, o efeito pode ser atribuído a um constituinte em menor proporção, como pode ser o caso do sesquiterpeno cariofileno 17,38 % encontrado também no óleo essencial de folhas *in natura*, ou de um sinergismo entre os compostos existentes no óleo.

#### 5.4.8 Atividades antiproliferativa e citotóxica do óleo essencial de folhas secas

Os resultados citotóxicos apresentados pode-se observar segundo Fouche *et al* uma fraca atividade em células de ovário 20,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 9). Porém foi estabelecido um índice de seletividade de 3,6 sendo mais citotóxico para células de ovário OVCAR 03 do que para células HaCat normais humanas.

**Tabela 9.** TGI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) – Resultados de atividade antineoplásica e citotóxica do óleo essencial de folhas secas de *Cinnamomum triplinerve*.

	2	m	A	7	4	P	o	H	K	q
<b>Doxo</b>	0,82	>25	9,9	1,7	2,6	2,0	<0,025	>25	9,2	0,026
<b><i>Cinnamomum triplinerve</i> (folhas secas)</b>	160,2	120,2	189,7	> 250	62,3	140,3	<b>20,9</b>	95,3	53,4	75,6

2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H40 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); h = HT29 (côlon); k = K562 (leucemia). Linhagem não tumoral humana: q = HaCat (queratinócitos imortalizados).

A espécie *Cinnamomum triplinerve* até o momento não foi reportada à literatura sua composição química e repectiva atividades biológica, pode ser observado um óleo promissor, em relação a atividades antibacterianas, sendo propostos futuros estudos para confirmar tais observações, contudo, o isolamento dos compostos e seus estudos tem grande potencial para abrir novas perspectivas no sentido de desenvolver um antimicrobiano eficaz podendo ser usado no tratamento de doenças infecciosas por microrganismos, como a linhagem de *Staphylococcus aureus*, associados a infecções de

pele, uma vez que foi confirmada a ação na triagem realizada com óleo de *Cinnamomum triplinerve* tanto em folhas *in natura* quanto em folhas secas.

## 6. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Cinnamomum triplinerve* coletada no Estado de Mato Grosso do Sul foi obtido a partir de folhas *in natura* e folhas secas, apresentando rendimentos das amostras de 0,37% e 0,16% respectivamente.

Houve grande diferença entre a composição química dos óleos. No óleo obtido de folhas *in natura* observou-se a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, enquanto que o óleo de folhas secas notou-se a presença exclusiva de sesquiterpenos.

Os principais compostos identificados no óleo essencial de folhas *in natura* foram os monoterpenos  $\alpha$ -pineno (13,5%),  $\beta$ -pineno (6,04%) e os sesquiterpenos E-nerolidol (24,5%) e cariofileno (17,38%). Sendo que no óleo de folhas secas foi identificado a presença de espatulenol com 83,73% de abundância.

Os ensaios antimicrobianos (MIC e Difusão em ágar) evidenciaram o potencial de inibição dos óleos. Os melhores resultados foram obtidos para concentração inibitória mínima (MIC) com o óleo de fohas secas com valores de 2,25 mg/mL<sup>-1</sup> com ação frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. O espatulenol provavelmente contribui para este melhor desempenho de inibição bacteriana, quando comparam-se os diferentes óleos.

Quanto às atividades citotóxicas o óleo extraído de folhas *in natura* de *Cinnamomum triplinerve* obteve-se citotoxicidade para as linhagens de glioma (40,5 µg/mL<sup>-1</sup>), rim (45,2 µg/mL<sup>-1</sup>), prótata (45,6 µg/mL<sup>-1</sup>), ovário (50,6 µg/mL<sup>-1</sup>) e leucemia (27,5 µg/mL<sup>-1</sup>), sendo que para células leucêmicas K 562 este óleo foi 2,3 vezes mais citotóxico do que para células HaCat normais humanas. Entretanto, o óleo de folhas secas obteve-se atividade para células de ovário (20,9 µg/mL<sup>-1</sup>) com índice de seletividade de 3,6 para esta linhagem de Ovcar 03 em relação à células HaCat normais humanas.

Vale ressaltar que plantas medicinais fazem parte do embasamento argumentativo em relação à importância da atividade citotóxica para preservação de ecossistemas, portanto, a espécie de *Cinnamomum triplinerve* pode estar entre as espécies de Lauraceas em ascensão do ponto de vista biológico, sendo potencial para descobertas de novos fármacos.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. JANSEN, A. M.; CHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. **Planta Medica**. New York, v. 53, p. 395-398, 1987.
2. CZELUSNIAK, K.E.; BRONCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L.; Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata Sprengel* e *Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.14, p. 400 – 409, 2012.
3. COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Efeito inibitório do óleo essencial de manjerição sobre o crescimento *in vitro* de *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agronômica**, v. 3, p.35-38, 2009.
4. ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; JUNIOR, V. F. V. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba elicaria* e suas atividades antioxidantes e antiagregante plaquetária. **Química Nova**, v. 33, p.141-145, 2010.
5. ESTANILAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivados em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, p. 95-100, 2001.
6. GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia**. UNIPAR, Umuarama, v. 15, p. 127-131. 2012.
7. PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial Crops and Products**. v.76, p.174-187. 2015.
8. PORTO, C. *Poiretia latifolia* e *Poiretia tetraphylla*: estudos dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares. (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC. Santa Maria, 2005.



9. UD-DAULA, A.F.M. S.; DEMIRCI, F.; SALIM; DEMIRCI, B.; LIM, B.L.L.; BASER, K.H.C.; AHMAD, N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils from leaves, aerial stems, basal stems, and rhizomes of *Etilingera fimbriobracteata* (K.Schum.) R.M. Sm. A.F.M.S. **Industrial Crops and Products**. v. 84. p. 189–198. 2016.
10. BONA, T. D. M. M. PICKLER L., MIGLINO L.B., KURITZA L.N., VASCONCELOS S.P. & SANTIN E. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 411-418, 2012.
11. COLEY, P. D. Effects of leaf age and plant life history patterns on herbivory. **Nature**, v. 284, p. 545-546, 1980.
12. DORMAN, H. J. D. & S. G. DEANS. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Application Microbiology**, v. 88, p.308-316, 2000.
13. LIMA, M.P.; ZOGHBI, M. das G.B.; ANDRADE, E.H. A.; SILVA, T.M.D.; FERNANDES, C. S.; Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazônica**. v. 35, p. 363 – 366. 2005.
14. ALVES, R.S.; **Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados sobre alimentos.** (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 2010.
15. MOOKDASANIT, J. ; TAMURA, H.; YOSHIZAWA, T.; TOKUNAGA, T. & NAKANISHI, K. Trace Volatile Components in Essential Oil of *Citrus sudachi* by Means of Modified Solvent Extraction Method, **Food Science Technology Research**, v.9, p.54–61, 2003.
16. TAMURA, H., PADRAYUTTAWAT, A. & TOKUNAGA, T. Seasonal change of volatile compounds of *Citrus sudachi* during maturation. **Food Science Technology Research**, v.5, p.156–160, 1999.
17. LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M.F.F.M.; TRAJANO, V.N. & MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p. 121-126, 2007.
18. STOJKOVIĆ, D. ; SOKOVIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; DŽAMIĆ, A.; RISTIĆ, M.; FAHAL, A.; KHALID, S.; DJUIĆ, I. & PETROVIĆ, S. Susceptibility of three clinical isolates of *Actinomodura madurae* to  $\alpha$ -pinene, the bioactive agent of *Pinus pinaster* turpentine oil. **Archives of Biological Science**, v.60, p.697-701, 2008.
19. FAHAL, A. H. Mycetoma thorn on the flesh. Review article. Transactions of the Royal Society of Tropical. **Medicine and Hygiene**, v.98, p.3-11, 2004.
20. CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J. & FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 247-253, 2002.
21. CONSTANTIN, M.B. ; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A.T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M.J.P.; OHARA, M.T., EMERENCIANO, V.P. & KATO, M.J.P.; essential oils

- form *Piper cernuum* and *Piper regnelli*: antimicrobial activities and analysis by CG-MS and <sup>13</sup>C-NMR. **Planta médica**, v. 67, p. 771-773. 2001.
22. GHERLARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.C.; MAZZANTTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene **II Farmaco**, v. 56, p. 387, 2001.
  23. CABO, J.; CRESPO, M.E.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A. The spasmolytic activity of various aromatic plants from the province of Granada. The activity of the major components of their essential oils. **Planta medica**, v. 20, p. 213. 1986.
  24. ALLEN, L. S.; RONALD, C. T.; JEROME, C. B.; JAMES, G. D., III; MILOS, S. A. New prodrug of paclitaxel: synthesis of Protaxel. **Anti-Cancer Drugs**, v.12, p. 305-313, 2001.
  25. CARNEIRO, F.B.; JÚNIOR, I.D.; LOPES, P.Q. & MACÊDO, R.O. Variação da quantidade de  $\beta$ -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 20, p.600- 606, 2010.
  26. PEIXOTO, F. P.; SANTOSB, D.; BARÃO A.; PALMEIRA C. M.; ROCHAD, S. M.; COIMBRA, M. A. Nerolidol disturbs mitochondrial bioenergetics but delays the permeability transition pore due a membrane antioxidant protective effect. **Biochymica et Biophysica Acta**, doi:10.2016/j.bbabbio.05.25. 2008.
  27. KIM, T.H.; THUY, N.T.; SHIN, J.H.; BAEK, H.H. & LEE, H.J. Aroma-Active Compounds of Miniature Beefsteakplant (*Mosla dianthera Maxim*). **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p.2877-2881, 2000.
  28. ARRUDA, D. C.; D’ALEXANDRI, A. M. K.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, p. 1679-1687, 2005.
  29. WATTENBERG, L. W. 1991. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). **Carcinogenesis**, v.12, p.151-152.-3,7,11-
  30. FRIZZO C.D.; DELLACASSA, E.; SERAFINI, L.A.; CASSEL, E. **Extração Supercrítica do Óleo Essencial de Planta Nativa do Gênero Baccharis**. In: Anais do XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering, XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, I Brazilian Congress of Phase Equilibrium and Fluid Properties for Chemical Process Design; Águas de São Pedro. 2000.
  31. QUEIROGA, C.L. **Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia***. p. 193. (Dissertação) Área de Concentração em Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1989.
  32. GELINSKI, J. M. L. N. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 131-144. 2007.
  33. BREHN-STECHER, B.F. & JHONSON, E. Sensibilização de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* a antibióticos pela nerolidol sesquiterpenos, Farnesol, Bisabolol e Apitone. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p.3357-3360, 2003.



34. KAMATOU, G.P.P. & VILJOEN, A.M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of  $\alpha$ -Bisabolol and  $\alpha$ -Bisabolol-Rich Oils. **Journal of the American Chemists` Society**, v. 87, n 1, p. 1-7, 2010.
35. SIMÕES, M.; ROCHA, S.; COIMBRA, M.A. & VIEIRA, M.J. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* antibiotic susceptibility using sesquiterpenoids. **Medicinal Chemical**, v.4, p.616–623, 2008.
36. KELSEY RG, REYNOLDS GW, RODRIGUEZ E. **Biology and chemistry of plant trichomes, Rodriguez E, Healey PL, Mentha I.**; 2ªed. Plenum Press, New York. 1984.
37. HARBONE, J.R. **Introduction to ecological biochemistry**. 4ªed. Academic. Press. London.1993.
38. LIMBERGER, R.P; SOBRAL, M. & HENRIQUES, A.T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quimica Nova**, v. 27, p. 916-919. 2004.
39. CANTRELL CL, KLUN JA, BRYSON CT, KOBASISY M, DUKE SO. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of American (*Callicarpa americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5948–5953. 2005.
40. FANARO, G.B.; DUARTE, R.C.; ARAÚJO, M.M.; PURGATTO, E. & VILLAVICENCIO A.L.C.H. Evaluation of  $\gamma$ -radiation on green tea odor volatiles. **Radiation Physics and Chemistry**, v.80, p. 85–88. 2011.
41. ORAV, A.; RAAL, A. & ARAK, E. Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries. **Natural Product Research**, v. 24, p. 48-55, 2010.
42. ALVES, M.F.; ISHII, H.I. Lauraceae no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, p. 179-192. 2007.
43. Angiosperm Phylogeny Group An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.16, p.105-121. 2009.
44. VAN DER WERFF, H.; RITCHER, H. G. **Toward an Improved Classification of Lauraceae**. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.83, p.409-418, 1996.
45. QUINET, A.; BAITELLO, J.B.; MORAES, P.L.R.X. LAURACEAE IN: FORZZA, R.C. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Acesso em maio 2016.
46. VATTIMO-GIL, I. Flora da cidade do Rio de Janeiro (Lauraceae). **Rodriguésia**, v.21/ 22, n.33, p. 157-176. 1959.
47. ALVES, J. L. H. & PAULA, J. L. 1997. **Madeiras Nativas; anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Ed. Gutenberg, Brasília, 541p.
48. SANTOS, S. O. ALVES, M. Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira. **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 14-28. 2013.

49. SIMIONATTO, E.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C.; SILVA, C. B.; CHAGAS, M. O.; POPPI, N. R.; PRATES, C. B.; MATOS, M. F. C.; SANTOS, E. C. S.; CARVALHO, J. E. Chemical composition and cytotoxic activity of leaves essential oil from *Mangifera indica* var. Coquinho (Anacardiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.22, p.596-599, 2010.
50. FAO. **Flavours and Fragrances of Plant Origin: Non-Wood Forest Products**. Chapter 2. *Cinnamomum* Oils (including *Cinnamon* and *Cassia*). 1995. <http://www.fao.org/>. Acesso: abr/2016.
51. TRAJANO, V.N.; LIMA, E. DE O.; SOUZA, E.L. DE; TRAVASSOS, A.E.R.; Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. Antibacterial property of spice essential oils on food contaminating bacteria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.29 n. 3, p. 542-545. 2009.
52. HO-KEUN KWON, 2009; BYOUNG SEOB KO B, WON KYUNG JEON B, SIN-HYEOG IM A,C, JI-SUN HWANG A, CHOONG-GU LEE A, JAE-SEON SO A Cinnamon extract suppresses tumor progression by modulating angiogenesis and the effector function of CD8+ T cells. **Cancer Letters**. v.278, p.174–182. 2009.
53. CANSIAN, R. L.; MOSSI, J. A.; OLIVEIRA, R. DE; TONIAZZO, G.; REICHEL, H; PAROUL, N.; ASTOLFI, V.; SERAFINI, L.A.; Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.30, p. 378-384. 2010.
54. QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. de; ALVES, F. M.; ASSIS, L. **Lauraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: Acesso em: 30/05/16
55. OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.
56. FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª ed. – Porto Alegre: Artmed, 2013.
57. ACOSTA, M. et al. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multiresistentes de origen nosocomial. **Revista de la Facultad de Farmacia**, Mérida, v. 45, p. 19-24, 2003.
58. TOMAZONI E. Z., PAULETTI, G. F., RIBEIRO, R. T. S., SCHWAMBACH, J. **Atividade antifúngica in vitro dos óleos essenciais de *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* sobre o fungo patógeno de tomateiro *alternaria solani* sorauer**. Caderno pedagógico, Lajeado, v. 11, p. 68-77, 2014. ISSN 1983-0882. 2014.
59. DEUS, R.J.A.; ALVES, C.N.; ARRUDA, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, p.1-7, 2011.
60. OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO,T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p.301-307. 2008.



61. MURRAY, R. et al. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 762 2004.
62. STRATEVAA, T., Atanasovaa, Savovb, D.E.; Petrovac, G.; Mitov, I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.20, p.127–133. 2016.
63. JETT BD, HUYCKE MM, GILMORE MS. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**. v.7, p.462–78. 17. 1994.
64. OLI AK, RAJU S, RAJESHWARI NAGAVENI S, KELMANI CR. Biofilm formation by Multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MREF) originated from clinical samples. **Journal of Microbiology and Biotechnology Researchgate**.; v.2, p. 284–818. 2012.
65. BISWAS, P.P, Dey S, Adhikari L, Sen A. Virulence markers of vancomycin resistant *enterococci* isolated from infected and colonized patients. **Journal of Global Infectious Diseases**. v. 6, p.157–63. 2014.
66. DI ROSA, R.; CRETÍ R, VENDITTI M.; Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **FEMS Microbiology Letters**.v.50, p. 256-145. 2006.
67. SANTOS, A. L. **Comportamento do Staphylococcus aureus em queijo minas frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54 p. (Dissertação) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
68. AKTURK, H.A.; SUTCUA, M.; SOMER, A.; AYDIN, D.; RUKIYE, C.; OZDEMIR, A.; COBAND, A.; INCE, Z.; AGOP C.; NURAN, S. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. **The brazilian journal of infectious disease**. v. 20, p.134–140. 2016.
69. YAO A. B.; XIUMEI XIAO A.; FEI WANG B.; LEI ZHOU A.; XIAOWEI ZHANG A.; JIE ZHANG. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p. 121-126, 2007.
70. CHUNG-CHIH LAI A.; ZHI-YUAN SHI B.C.; YEN-HSU CHEN A.; D.E. FU-DER WANG. Effects of various antimicrobial stewardship programs on antimicrobial usage and resistance among common gram-negative bacilli causing health care-associated infections: A multicenter comparison. **Journal of microbiology, immunology and infection**.v. 49, p. 74-82, 2016.
71. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/bibliografia.htm#](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/bibliografia.htm#) 2007. acesso em fev. de 2016.
72. GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M.T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agente**, Universidade de São Paulo. **Química nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.



73. VANDEN B., DA; VLIETINCK, AJ. **Métodos de rastreio para agentes antibacterianos e antivirais de plantas superiores**. Em: Dey, PM, Harbone, JD (eds), Métodos em bioquímica. Academic Press, Londres, p. 47-69. 1991.
74. VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR, A.S. Screening methods to determine antibacterial activity of natural product. **Brazilian journal of microbiology**. v. 38, p.369-380. 2007.
75. RODRIGUES, E.A.C. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier,. 28p. 1997.
76. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/propriedades2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/propriedades2.htm), 2008. Acesso em set de 2016.
77. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 março. 2004.
78. ARAÚJO, J.C.L.V.; LIMA, E.O.; CEBALLOS, B.S.O; FREIRE, K.R.L.; SOUZA, E.L.; FILHO, L.S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**. v. 33, p. 55-64, 2004.
79. BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. **Food Chem. Toxicol**. v.46, p.446–475.
80. ALVES, E.G. VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; ANDRADE E SILVA, M.L.; CUNHA, R. W.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
81. NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**, v. 29, p. 145-150, 2007.
82. INCA, BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto nacional de câncer. Coordenação de prevenção e vigilância de câncer. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2011.
83. AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **The history of cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/documents/webcontet/002048-pdf.pdf>. Acesso em ago de 2016.
84. YOU, J.S.; JONES, P.A. Câncer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer cell**. v. 22 p. 9-20, 2012.
85. HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; Lee, C. C. **The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity**. *Methods*, v. 42, p.377-387, 2007.

86. AMARAL, R. G.; **Avaliação da atividade antitumoral da *Mentha x villosa* (Lamiaceae)**. (Dissertação). Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2014.
87. MONKS A, SCUDEIRO D, SKEHAN P, SHOEMAKER R, PAULL K, VISTICA D, HOSE C, LANGLEY J, CRONISE P, VAIGRO-WOLFF A, GRAYGOODRICH M, CAMPBELL H, MAYO J, BOYD M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the national cancer institute**. v. 83, p. 757-766 1991.
88. NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**., v. 70, p. 461-477, 2007.
89. OGASAWARA, D.C. **Constituintes químicos e atividades antioxidante antiproliferativa de extratos de *Astraea klotzsch* e *croton* (Euphorbiaceae)**. (Dissertação). Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo. 2012
90. CARVALHÃES, S.F.; COSTA, D.L.; MAZZEI, J.L.; TADDEI, L.E.M.; DA'AVILA, L.A. Alternative extration of aerobic anticarcinogens from Brazilian "*Vinca rosea*" using ion Exchange chromatography. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.12, p. 83-84. 2002.
91. MOURA, M.D.; TORRES, A.R.; OLIVEIRA, A.G.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. Natural products inhibitors of models of mammary neoplasia. **Brish Journal of Phytotherapy**, v. 5, p. 124-145, 2001.
92. SILVA, J.P.S.; MOURA, M.D.P.; OLIVEIRA, R.A.G.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. Natural produts inhibitors of ovarian neoplasia. **Phytomedicine**, v.10, p.221-232. 2003.
93. BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, dot: 10.1002/JSFA. 6267, p.1-11, 2013.
94. BEZERRA, D.P. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil fromleaves of *Gutteria friesiana*. **Planta Medica**, DOI: 10.1055/s-0031-1298173,p.1-6, 2011.
95. AFOULOUS, S.; FERHOUT, H.; RAOELISON, E.G.; VALENTIN, A.; MOUKARZEL, B.; COURDEC, F.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticâncer, antiinflammatory, antioxidante and antimalarial activies of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, v.56, p.352-362, 2013.
96. RIBEIRO, S.S.; DE JESUS, A.M.; DOS ANJOS, C.S.; DA SILVA, T.B.; SANTOS, A.D.C.; DE JESUS, J.R.; ANDRADE, M.S.;SAMAPAI, T.S.;GOMESS, W.S.; ALVES, P.B; CARVALHO. A.A.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; PINHEIRO, M.L.B.; PRATA, A.P.; BLANK, A.F.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V.R.S.; COSTA, E.V. NOGUEIRA, P.C.; BEZERRA, D.P.; Evolution of the citotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta medica**, v. 78, p. 1601-1606, 2012.
97. MAEDA, H.; YAMAZAKI, M.; KATAGATA, Y.; Kuromoji (*lindera umbellate*) essential oil- induced apoptosis and differentiation in human leukemia HL-60 cells. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 3, p. 49- 52. 2012.
98. FONTES, J.E.N; FERRAZ, R.P.C.; BRITTO, A.C.S.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Gualtirea pogonopus* (Annonaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 722-729. 2013.



99. FERRAZ R.P.C.; BONFIM, O.S ; CARVALHO, N. C.; SOARES,M.B.P.; Da SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A. P.N.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P. Citotoxic effect of leaf essential oil *Lippia gracilis* shouer (Verbanaceae). **Phytomedicine**, v.20, p. 615-621, 2013 a.
100. QUINTANS, J.P.S.S.; SOARES, B.M.; FERRAZ, R.P.C.; OLIVEIRA, A.C.A.; SILVA, T.B.; MENEZES, L.R.A.; SAMPAIO, M.F.C.; BEZERRA, D.P. Chemical constituents and anticancer effect of the essential oil from leaves of *Xylopi laevigata*. **Planta medica**, v. 79, p. 123-130, 2013.
101. FERRAZ R.P.C.; CARDOSO, G.M.B.; Da SILVA, T.B.; FONTES, J.E.N.; PRATA, A.P.N .; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D.P. Antitumour properties of leaf essential oil of *Xylopi frutecens aubl.* (annonaceae). **Food chemistry**, v. 141, p. 196-200, 2013 b.
102. SADEGHI, I.; YOUSEFZADI, M.; BEHMANESH, M.; SHARIF, M.; MORADI, A.; *In vitro* cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *satureja intermedia*. **Irian red crescent medida jornal**, v. 15, p. 70-74, 2013.
103. FIGUEIREDO, P. O. GARCEZ, F. R., MATOS, M. F. C., PERDOMO, R. T., QUEIROZ, L. M. M., POTT, A., GARCEZ, A. J. S., GARCEZ, W. S. A new cytotoxic  $\beta$ -carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. **Planta medica**, v.77, p.1852–1854, 2011.
104. MATOS, M. F. C.; LEITE, L. I. S. P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J. M. DE.; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F. G.; SILVA, D. B. DA. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, v.77, p.227-229, 2006.
105. ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Illinois EUA: **Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, 804 p. 2001.
106. NCCLS. National committe for clinical laboratory standards. **Performname standards for antimicrobial disk susceptibility tests aproved standard** – eighth edition. NCCLS document M2 – A8. Wayne, Pensylvania; NCCLS, 2003.
107. NCCLS. National committe for clinical laboratory standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptiblity tests for bacteria that grow aerobically aproved standard** – sixth edition. NCCLS document M7 – A6. Wayne, Pensylvania; NCCLS, 2003.
108. FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L.; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D; CAVALCANTI, Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira plantas medicinais**, Campinas, v.16, supl. I, p.372-377, 2014.
109. SKEHAN, P.;STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J. VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYED,M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer- drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.
110. POZZATI, P. LORETO, E.S.; LOPES, P.G.M.; ATHAYDE, M.L.; SANTURIO, J.M.; ALVES S.H.; Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**. v. 53, p.5-12, 2009.



111. BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B.; FURNALETO, M.C. **Microbiologia básica**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2010.
112. SHOEMAKER, R. H. The NCI 60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature reviews: cancer**. v. 6, p. 813-823, 2006.
113. KUSPRADINI H., PUTRIB A.S.; SUKATONC, E.; MITSUNAGA T. International Conference on Food, Agriculture, and Natural Resources, FANRes2015 Bioactivity of Essential Oils from Leaves of *Dryobalanops lanceolata*, *Cinnamomum burmannii*, *Cananga odorata*, and *Scorodocarpus borneensis*. ScienceDirect. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. v. 9, p. 411 – 418, 2016.
114. KLENICY K. L.; YAMAGUCHI, E.; VEIGA JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v. 36, p. 826-830, 2013.
115. YOKOMIZO, N.K.S.; NAKAOKA-SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.16. Botucatu. 2014.
116. HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal Nature Product**, v.50, p.19-22. 1987.
117. ARESI, C.; **Avaliação da Potencial Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural: Estudo Bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2011.
118. CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA (CNCFlora) ***Cinnamomum triplinerve* lista vermelha da flora brasileira**. Versão 2012.
119. FOCHE G<sup>1</sup>, CRAGG GM, PILLAY P, KOLESNIKOVA N, MAHARAJ VJ, SENABE J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 119 455-461. 2008.

