



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de

Protium heptaphyllum, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica*

FABIANA BARCELOS FURTADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: Estrutura e Função.

Orientador: *Prof. Dr. Ary Fernandes Junior*

**BOTUCATU – SP
2018**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de

Protium heptaphyllum, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica*

FABIANA BARCELOS FURTADO

PROF. DR. ARY FERNANDES JUNIOR

Orientador

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: Estrutura e Função.

Orientador: *Prof. Dr. Ary Fernandes Junior*

**BOTUCATU – SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Furtado, Fabiana Barcelos.

Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica* / Fabiana Barcelos Furtado. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Ary Fernandes Junior
Capes: 20100000

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Mamas - Câncer. 3. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 4. Fármacos. 5. Células cancerosas.

Palavras-chave: MCF-10A; MDA-MB-231; Óleos essenciais; *Paracoccidioides brasiliensis*; Tumor de mama.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao professor Dr. Ary Fernandes Junior pelo respeito, consideração e valorização dos meus conhecimentos prévios, por ter sido um grande colaborador na minha evolução como pesquisadora e pelo apoio em todos os aspectos que eu precisei na execução desta pesquisa.

Aos meus colaboradores, doutorandas Bruna Cristina Borges e Thaise Lara Teixeira, Dr. Hans Garcia Garces, Dr. Luiz Domingues de Almeida Junior, professor Dr. Claudio Vieira da Silva, Dr. Mário Machado Martins, professor Dr. Eduardo Bagagli e professor Dr. Luiz Claudio Di Stasi pela ajuda na execução dos experimentos, por contribuírem com reagentes e equipamentos, contribuição na interpretação de resultados e sugestões.

Ao Dr. Sérgio Akira Adachi que, com seus conhecimentos botânicos, contribuiu nas etapas de coleta e identificação das plantas. Aos demais especialistas, Dra. Inara Regiane Moreira Coneglian, Dra. Maria Estela Silveira Paschoal e Dr. Flávio Macedo Alves pela confirmação das identificações.

Ao meu namorado Rodrigo Santos Lima, pelas importantes sugestões e contribuições na publicação do artigo gerado a partir dos resultados desta tese.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por dar suporte à execução dos experimentos.

A todas as pessoas amigas que conheci em Botucatu, em especial Ana Cláudia Acerra e Tia Cata pelo carinho e atenção.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo suporte financeiro para a execução dos experimentos.

RESUMO

Espécies vegetais são fontes de moléculas biologicamente ativas que têm um importante papel no desenvolvimento de novos fármacos e, portanto, suas propriedades merecem ser investigadas. Apesar de serem espécies aromáticas e apresentarem um potencial farmacológico, algumas atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica* ainda não foram avaliadas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação citotóxica, antileishmania e antimicrobiana destes óleos essenciais com o intuito de estabelecer espécies vegetais com potencial uso na elaboração de fármacos ou como terapias complementares aos tratamentos convencionais de doenças de impacto em saúde pública. Os óleos essenciais foram obtidos por destilação de folhas frescas por arraste de vapor, a composição química determinada por análises de cromatografia gasosa/espectrometria de massas, as atividades biológicas testadas utilizando o método de microdiluição e a verificação dos mecanismos de morte celular feita por citometria de fluxo. *B. salicifolius* e *B. dracunculifolia* apresentaram elevado rendimento (0,86% e 0,89% respectivamente) quando comparado aos demais óleos essenciais avaliados. *H. brasiliense* e *B. salicifolius* apresentaram resultados promissores sobre linhagens tumorais Ehrlich (51,59 e 42,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e MDA-MB-231 (62,40 e 46,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com maior ação seletiva para estes tipos celulares se comparado a célula normal de mama MCF-10A (>512 e 314,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados de citometria de fluxo mostraram que o óleo de *B. salicifolius* não atua por indução de morte celular mas sim causando um prejuízo no metabolismo, especificamente em células tumorais. Já o tratamento com o óleo de *H. brasiliense* induziu morte celular principalmente por necrose em células tumorais de mama, mas não em células normais. Além disto, *H. brasiliense*, *B. salicifolius* e *N. megapotamica* apresentaram ação inibidora sobre *Paracoccidioides brasiliensis* (234,37; 156,25; 468,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mostrando assim potencial no tratamento da paracoccidioidomicose. Contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* não foram observados resultados relevantes. Os óleos de *B. salicifolius* e *B. dracunculifolia*, ainda que tenham apresentado ação sobre *Leishmania amazonensis*, foram citotóxicos para macrófagos, uma de suas principais células hospedeiras, sendo assim pouco interessante a investigação destes voláteis frente à forma amastigota. Os óleos essenciais avaliados, nas suas presentes constituições químicas, foram ineficazes contra *Staphylococcus aureus* metilina resistente e metilina sensível, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para *Staphylococcus aureus* metilina sensível o óleo essencial de *H. brasiliense* atuou em sinergismo com as drogas cefalotina e oxacilina, já para *E. coli*, a droga gentamicina atuou de forma sinérgica com os óleos essenciais de *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, e *N. megapotamica*, levando as drogas a apresentarem seus efeitos bactericidas a $\frac{1}{4}$ da concentração de suas doses efetivas. Em conclusão, alguns dos resultados aqui destacados, sobretudo para óleos de *H. brasiliense* e *B. salicifolius*, sugerem que nestas espécies há a presença de moléculas potencialmente ativas que podem servir como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. MDA-MB-231. Ehrlich. MCF-10A. Óleos essenciais. Tumor de mama. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Plant species are sources of biologically active molecules that play an important role in the development of new drugs, and therefore, their properties deserve to be investigated. In this regard, *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* and *Nectandra megapotamica* are aromatic species with pharmacological potential, producing essential oils whose biological activities had not yet been investigated. The aim of this work was to assess any cytotoxic, antileishmania, or antimicrobial action of these essential oils to determine those plant species with potential in the elaboration of drugs or in complementary treatments of diseases with an impact on public health. Essential oils were obtained from fresh leaves by steam distillation. Chemical composition was determined by gas chromatography/mass spectrometry. Biological activities were assessed using the microdilution method while cell death was checked by flow cytometry. *B. salicifolius* and *B. dracunculifolia* presented high yields (0.86% and 0.89%, respectively) relative to the other species assessed. *H. brasiliense* and *B. salicifolius* showed promising action on Ehrlich (at 51.59 and 42.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration respectively) and MDA-MB-231 tumor lines (at 62.40 and 46.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration respectively), with less selective action against normal MCF-10A breast cells (at > 512 and 314.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration respectively). Flow cytometry results showed that *B. salicifolius* oil does not induce cell death but rather acts causing metabolic impairment, specifically in tumor cells. Essential oil from *H. brasiliense* induced cell death in breast tumor cells, mainly due to necrosis, but not in normal cells. In addition, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, and *N. megapotamica*, presented inhibitory action on *Paracoccidioides brasiliensis* (at 234.37, 156.25, and 468.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration respectively), thus showing potential in the treatment of paracoccidioidomycosis. Significant action was not observed against *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. The oils of *B. salicifolius* and *B. dracunculifolia* did present action against *Leishmania amazonensis* but were also cytotoxic to macrophages, one of its main host cells, therefore not being of interest against the amastigote form of the parasite. The essential oils studied here were ineffective against *Staphylococcus aureus* (whether resistant or sensitive to methicillin), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. On methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* though, the action of *H. brasiliense* essential oil was synergistic with that of drugs cefalotin and oxacillin. On *E. coli*, use of the drug gentamicin benefitted from the synergistic action of essential oils from *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, and *N. megapotamica*, which made the drug effective at 1/4 lower doses. In conclusion, some of the results highlighted here, especially for *H. brasiliense* and *B. salicifolius*, show that essential oils in these species include active molecules having potential in the development of new drugs.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. MDA-MB-231. Ehrlich. MCF-10A. Essential oils. Breast tumor. Flow cytometry.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	8
2 Revisão bibliográfica.....	9
2.1 Câncer e células tumorais.....	9
2.2 Leishmaniose e <i>Leishmania amazonensis</i>	10
2.3 Patógenos e doenças infecciosas.....	10
2.4 Espécies vegetais investigadas.....	12
2.4.1 <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand.....	12
2.4.1.1 Óleo essencial das folhas de <i>P. heptaphyllum</i>	14
2.4.2 <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex Miq.....	14
2.4.2.1 Óleo essencial das folhas de <i>H. brasiliense</i>	16
2.4.3 <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O.Berg.....	16
2.4.3.1 Óleo essencial das folhas de <i>B. salicifolius</i>	18
2.4.4 <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.....	19
2.4.4.1 Óleo essencial das folhas de <i>B. dracunculifolia</i>	21
2.4.5 <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez.....	23
2.4.5.1 Óleo essencial das folhas de <i>N. megapotamica</i>	25
3 Objetivos.....	27
4 Material e Métodos.....	28
4.1 Preparação do material vegetal e extração dos óleos essenciais.....	28
4.2 Caracterização química.....	28
4.2.1 Análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	28
4.3 Atividades biológicas.....	30
4.3.1 Atividade citotóxica.....	30
4.3.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo.....	31
4.3.3 Atividade antileishmania.....	32
4.3.4 Atividade antifúngica.....	33
4.3.5 Atividade antibacteriana.....	34
4.3.6 Sinergismo com drogas antibacterianas.....	35
4.4 Análises estatísticas.....	35
5 Resultados e Discussão.....	36

5.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais.....	36
5.2 Atividades biológicas.....	45
5.2.1 Atividade citotóxica.....	45
5.2.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo.....	49
5.2.3 Atividade antileishmania.....	52
5.2.4 Atividade antifúngica.....	53
5.2.5 Atividade antibacteriana.....	56
5.2.6 Sinergismo com drogas antibacterianas.....	58
6 Conclusões.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A - Identificação dos componentes dos óleos essenciais.....	97
APÊNDICE B – Tabela de correlação.....	100

1 Introdução

Segundo Newman e Cragg (2016), os produtos naturais apresentam, nos dias atuais, um papel significativo na descoberta e desenvolvimento de fármacos para tratamento de doenças em humanos. O reino vegetal possui grande variedade e complexidade de metabólitos não envolvidos em funções vitais, conhecidos como metabólitos secundários, normalmente sintetizados pelas plantas como mecanismos de defesa frente às condições de adaptação (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Os Óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis sintetizados por plantas aromáticas frequentemente encontradas nas famílias Lamiaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Lauraceae e Verbenaceae, dentre outras (CASTRO; RAMOS, 2003). São misturas complexas de composição variada, predominando na sua constituição os terpenos (cerca de 90%) e derivados de fenilpropano (WAGNER et al., 1984). Sabe-se que fatores bióticos e abióticos afetam a síntese destes compostos qualitativa e quantitativamente (CASTELO et al., 2012) e, portanto, plantas diferentes podem apresentar a constituição química de seus óleos essenciais variada, ainda que sejam da mesma espécie.

Dentre as propriedades biológicas, os compostos voláteis dos óleos essenciais apresentam diversas atividades, incluindo antinociceptiva, anticancerígena, antiinflamatória, inseticida, antiviral, antioxidante, antiespasmódica, antidiabética, antibacteriana, antifúngica e apresentam ainda efeitos imunomoduladores, psicotrópicos, acaricida e expectorantes (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; EDRIS, 2007; LANG; BUCHBAUER, 2011; PISSERI; BERTOLI; PISTELLI, 2008).

Plantas com propriedades antimicrobianas são de grande relevância, pois podem se apresentar como uma alternativa de tratamento devido aos problemas associados ao uso de antibióticos, principalmente àqueles relacionados à resistência de alguns microrganismos frente a vários medicamentos (KOKOSKA et al., 2002). Além disso, há uma necessidade também do desenvolvimento de fármacos para uso no tratamento de doenças parasitárias, visto que são causas consideráveis de morbidade e mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento (OGUNGBE; SETZER, 2016). Os metabólitos de plantas com propriedades anticancerígenas também são de grande interesse, sobretudo pelo fato de terapias convencionais apresentarem resistência, alto custo e efeitos colaterais severos (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014). Assim, em função de suas inúmeras propriedades biológicas, os óleos

essenciais e compostos isolados podem resultar no desenvolvimento de fármacos e contribuir para avanços nessa área da pesquisa científica.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Câncer e células tumorais

O câncer é uma doença de causa multifatorial que se dá pelo crescimento descontrolado de células anormais, levando ao desenvolvimento de um tumor. O alto custo, aumento de resistência a drogas e efeitos colaterais das abordagens terapêuticas atuais estão levando os cientistas a explorar a medicina natural como uma opção para encontrar novas moléculas para o tratamento desta doença (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014). O estudo de produtos naturais tem sido uma estratégia de sucesso na descoberta de novos fármacos usados na terapia anticâncer, pois mais de dois terços das drogas aprovadas entre 1940s e 2006 vieram diretamente de produtos naturais ou foram desenvolvidas com base nos seus compostos ativos (EFFERTH, 2010).

O câncer de mama está associado à expressão de um ou múltiplos receptores de hormônios, tais como receptores de estrógeno, de progesterona e receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. Hormônio-terapia ou terapias moleculares são usadas efetivamente para estes tipos de câncer, entretanto grandes dificuldades estão associadas ao tratamento do tipo triplo-negativo, ou seja, daqueles que não possuem nenhum destes receptores. Este câncer geralmente tem um prognóstico ruim e a descoberta de agentes efetivos para este alvo tem sido um desafio na oncologia (NAKAGAWA-GOTO et al., 2016).

As células MCF-7 são uma linhagem celular de câncer de mama isolada de humano e são modelos sensíveis à terapia hormonal para estudos *in vitro* e *in vivo*, pois possuem receptores de estrógeno e progesterona (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015). Já as células MDA-MB-231, uma linhagem de mesmo tecido e origem, são mais agressivas e não respondem à terapia hormonal pelo fato de serem triplo-negativas, sendo seu tratamento limitado à quimioterapia (ROCHEFORT et al., 2003). No entanto, agentes quimioterápicos induzem efeitos tóxicos também nas células normais, devendo ser prescritos com cautela (RZEPECKA-STOJKO et al., 2015).

2.2 Leishmaniose e *Leishmania amazonensis*

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta principalmente as populações dos países em desenvolvimento e é causada pelas espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (ORYAN, 2015). O tipo cutânea é a forma mais comum da doença, causada, principalmente, por *L. amazonensis* (BRASIL, 2013), gerando lesões cutâneas em partes expostas do corpo e deixando cicatrizes permanentes (WHO, 2016). Cerca de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo (WHO, 2016). Os agentes causadores dessa doença apresentam duas formas morfológicas: promastigota e amastigota. As formas promastigotas são fusiformes e apresentam um longo flagelo, são extracelulares e vivem no trato digestório do inseto vetor, sendo introduzida no hospedeiro vertebrado através da picada (COSTA, 1998). Já as formas amastigotas são arredondadas e têm um flagelo curto, são intracelulares e parasitam principalmente macrófagos dos vertebrados (NAKAMURA et al., 2006).

Drogas convencionais contra leishmaniose apresentam sérios efeitos colaterais, toxicidade, têm alto custo, levam à resistência e não são tão eficazes (ORYAN, 2015). Dessa maneira, a busca de produtos naturais que atuem contra protozoários pode abrir perspectivas na descoberta de drogas mais efetivas, com menores efeitos tóxicos e de custo mais acessível.

2.3 Patógenos e doenças infecciosas

Patógenos como bactérias e fungos têm sido a maior causa de doenças humanas e estão dentre as maiores ameaças à saúde pública, devido ao surgimento de linhagens resistentes (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012; BAJPAI; SHUKLA; SHARMA, 2013). Há uma necessidade de prospecção de novas moléculas que tenham eficiência frente a microrganismos resistentes e, para tal, ensaios *in vitro* representam a primeira linha de ação neste processo.

Candida spp. são comumente encontradas na pele e nas superfícies de mucosas da região gastrointestinal e genitourinárias de seres humanos, associando-se a estes de forma comensal. No entanto, podem se tornar patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos, o que leva ao desenvolvimento de infecções locais ou sistêmicas (KABIR; AHMAD, 2013). Estudos de vários centros médicos documentam a crescente relevância clínica do gênero *Candida*, por este ser o principal agente causador de fungemias (KOŁACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016).

Dermatófitos são fungos que invadem e se propagam em superfícies queratinizadas de mamíferos, causando infecções contagiosas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). As espécies *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* estão dentre as mais importantes, pois são agentes etiológicos de dermatofitoses em humanos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995) e embora sejam geralmente infecções restritas a epiderme, podem se tornar invasivas e disseminadas (PERES et al., 2010).

Outro fungo de grande importância clínica é o *Cryptococcus neoformans*, principal agente etiológico da criptococose, uma infecção também oportunista relacionada a altas taxas de mortalidade em indivíduos imunossuprimidos (COELHO; CASADEVALL, 2016) e caracterizada por pneumonia e meningoencefalite (PARK et al., 2009; HOLE; WORMLEY, 2016).

Entre as micoses sistêmicas, outra micose que tem um importante impacto na saúde pública é a paracoccidioidomicose, que apresenta como um dos agentes causadores o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. É uma micose sistêmica que, se não controlada pela resposta imune dos pacientes, pode acarretar no desenvolvimento de manifestações clínicas, envolvendo em fase crônica os pulmões e outros órgãos (RASTREPO; TOBÓN; CANO, 2015). É endêmica da América Latina e, dentre os óbitos por micoses sistêmicas no Brasil, é a que apresenta maior taxa de mortalidade (COUTINHO et al., 2002).

Limitadas opções de tratamento e alta capacidade adaptativa de patógenos a drogas atualmente usadas estão associadas a altas taxas de mortalidade por infecções fúngicas (KOŁACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016), portanto é de suma importância a descoberta de novos produtos que atuem principalmente frente a organismos de importância clínica como os aqui destacados.

Staphylococcus aureus é um dos patógenos humanos mais problemáticos, causando infecções graves e dispendiosas em todo o mundo (LOWY, 1998). *S. aureus* metilina resistente (MRSA) são resistentes a todas as penicilinas disponíveis e outras drogas β -lactâmicas (DAVID; DAUM, 2010) e juntamente com *S. aureus* metilina sensível (MSSA), classificam-se como a segunda causa mais comum de infecções hospitalares associadas à corrente sanguínea e estão associadas a um aumento da mortalidade e uma maior permanência hospitalar (ESPOSITO et al., 2013). Além disto, estes microrganismos são também uma importante causa de infecções na pele e tecidos moles, pneumonia, artrite séptica, endocardites e osteomielites (LOWY, 1998).

Como *S. aureus*, o bacilo gram-negativo *Escherichia coli* também é uma das principais causas de infecções da corrente sanguínea (MIAJLOVIC; SMITH, 2014). Além disso, é a causa dominante de infecções no trato urinário (CONOVER et al., 2016) e um importante agente na colite hemorrágica e diarreia (SU; BRANDT, 1995). As infecções por *E. coli* continuam a ser um problema de saúde pública e são recorrentes devido aos fatores de virulência que afetam vários processos celulares (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria oportunista Gram-negativa que causa infecções em pacientes imunocomprometidos ou que apresentam barreiras epiteliais rompidas. Podem levar a quadros agudos, resultando em sepse com conseqüente morte ou infecções crônicas que podem persistir por anos (TALWALKAR; MURRAY, 2016). Esta bactéria é uma das principais causadoras de infecções nosocomiais (STRYJEWSKI; SEXTON, 2003) e está correlacionada com alta morbidade e mortalidade (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2016).

S. aureus, *E. coli* e *P. aeruginosa* estão dentre as principais bactérias multirresistentes a drogas antimicrobianas (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012). Esse fato, aliado à importância clínica aqui destacada justifica a busca por novos agentes que possam ser eficazes contra estes microrganismos.

2.4 Espécies vegetais investigadas

2.4.1 *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand

A espécie *Protium heptaphyllum* (Burseraceae) (Figura 1) tem origem nativa e não endêmica do Brasil. É conhecida popularmente como Breu-branco, sendo presente nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica que correspondem a grande parte do território brasileiro (DALY, 2015). Tem hábito arbóreo com aproximadamente 10 m de altura, tronco espesso com 50-60 cm de diâmetro na base e casca vermelho escura. Sua casca é rica em resina aromática, constituída de triterpenos pentacíclicos, sendo utilizada para fins medicinais pelas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, cicatrizante e expectorante (MOBIN et al., 2016). É conhecida comercialmente como resina de almécega, aimam ou almíscar (LORENZI, 1992).

Os constituintes químicos e atividades biológicas de *P. heptaphyllum* foram descritos por vários autores. O extrato das folhas apresentou atividade cercaricida (FRISCHKORN;

FRISCHKORN; CARRAZZONI, 1978) e o extrato dos frutos mostrou atividade anticolinesterásica (FRISCHKORN; FRISCHKORN; CARRAZZONI, 1978; BANDEIRA et al., 2002). Já o extrato da casca foi citostático contra linhagens de células tumorais (TAYLOR et al., 2012).

O óleo essencial dos frutos mostrou ação acaricida, de deterrência na oviposição e repelência do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*) (PONTES et al., 2007). Já o óleo essencial da resina apresentou capacidade anti-inflamatória, inibitória da produção do óxido nítrico, atividade antimutagênica (DE LIMA et al., 2016), ação antifúngica sobre espécies de *Candida* (MOBIN et al., 2016) e ainda atividades antitumoral *in vitro* e citotóxica frente a larvas de *Artemia salina* (SIANI et al., 1999; CITÓ; COSTA; LOPES, 2006). Quanto ao óleo fixo da resina, observou-se efeito no tratamento de prurido, feridas e capacidade cicatrizante, hepatoprotetora, antinociceptiva, gastroprotetora, anti-inflamatória, antioxidante, antifúngica, ansiolítica, sedativa, antidepressiva, analgésica, antihiperglicêmica e hipolipidêmica (SUSUNAGA, 1996; ARAGÃO, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA, 2005a,b; LIMA-JÚNIOR et al., 2006; HOLANDA PINTO et al., 2008; MELO et al., 2011; SANTOS et al., 2012; BANOV, 2016; SALES et al., 2016).

Figura 1 – Ilustração das partes aéreas de *Protium heptaphyllum*.



Fonte: Antheunisse (2016)

2.4.1.1 Óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum*

Bandeira et al. (2001) identificaram como componentes majoritários o mirceno (18,6%), β -cariofileno (18,5%), α -humuleno (8,0%) e biciclogermacreno (7,3%). Pontes et al. (2007), mostraram a ação deste óleo frente ao ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), com propriedade de acaricida e de deterrência na oviposição. Os compostos majoritários identificados foram 9-epi-(*E*)-cariofileno (21,4%), 14-hidroxi-9-epi-(*E*)-cariofileno (16,7%), trans-isolongifolanona (10,3%), β -felandreno (9,2%) e α -copaeno (7,3%) (PONTES et al., 2007).

Frischkorn, Frischkorn e Carrazzoni (1978) mostraram o efeito deste óleo contra a cercária de *Schistosoma mansoni*. Araujo et al. (2011), relataram efeito gastroprotetor e identificaram como componentes majoritários o α -pineno (40,32%), p-menta-1,4(8)-dieno (12,14%), α -felandreno (10,27%), p-cimeno (9,64%) e m-menta-1,8-dieno (8,88%). Citó, Costa e Lopes (2006), identificaram como principais constituintes o β -cariofileno (32,08%), germacreno B (16,71%), trans- β -ocimeno (15,74%) e o ledeno (14,58%). Zoghbi, Maia e Luz (1995) identificaram como majoritários o β -elemeno (22,09%), terpinoleno (15,45%), β -cariofileno (11,11%) e α -humuleno (7,19%).

No óleo essencial de folhas de *P. heptaphyllum* coletadas na Colômbia, Tafurt-García e Muñoz-Acevedo (2012) identificaram como majoritários o guaiol (14,4%), α -copaeno (8,6%), 1,10-di-epi-cubenol (8,1%), óxido de cariofileno (6,2%), trans- β -cariofileno (5,7%), espatulenol (5,6%) e γ -cadineno (5,4%). De Carvalho et al. (2013) encontraram o α -copaeno (11,8 %), trans-cariofileno (16,9 %) e germacreno B (12,8%) como principais constituintes.

2.4.2 *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq.

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae) (Figura 2) é não endêmica do Brasil, tem origem nativa e se distribui nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (LEITMAN, 2015). É uma espécie sublenhosa, geralmente de pequeno porte, raramente ultrapassando 3 m de altura, com folhas carnosas (SOUZA; LORENZI, 2005). A base de dados Tropicos (“Tropicos -*Hedyosmum brasiliense*”) considera *H. brasiliense* como sinonímia de *Hedyosmum bonplandianum* Kunth, dentre outros, sendo um nome também aceito para esta espécie o *Hedyosmum racemosum*. É conhecida popularmente como cidrão, cidreira, erva-cidreira, âmbar-vegetal, canela cânfora, chá ou erva-de-bugre, chá-de-indio, chá ou erva-de-soldado, erva-almíscar, hortelã-do-brejo e hortelã-silvestre (REITZ, 1970). É utilizada

na medicina popular no tratamento de enxaqueca, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, dores de estômago, como diurético, e na forma de vinho, é um tônico afrodisíaco (REITZ, 1970; TODZIA, 1988).

Trentin et al. (1999) comprovaram atividade antinociceptiva do extrato e de uma lactona sesquiterpênica isolada de *H. brasiliense*. Segundo Tolardo et al. (2010), o extrato desta espécie apresenta ainda atividades psicofarmacológicas, incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e hipnóticos. Gonçalves et al. (2012) comprovaram o efeito antidepressivo, mostrando o mecanismo de ação pelo qual o extrato e uma lactona sesquiterpênica isolada de *H. brasiliense* atuam. Lactonas sesquiterpênicas, compostos fenólicos e ácidos graxos foram isolados e caracterizados nas folhas de *H. brasiliense* e ainda testados sobre *Mycobacterium tuberculosis*, porém não apresentaram atividade *in vitro*. Por outro lado, estas substâncias foram capazes de reverter o efeito induzido pelo peptídeo β -amiloide, relacionado à doença de Alzheimer e ainda tiveram ação no relaxamento de anéis aórticos e corpos cavernosos de camundongos (AMOAHA et al., 2013; AMOAHA, et al., 2015a,b,c). Recentemente, outros autores também comprovaram as propriedades afrodisíacas da fração hexânica e de compostos isolados desta espécie (LEITOLIS et al., 2016).

O extrato das folhas e flavonoides glicosilados isolados exibiram atividade analgésica em ratos (CÁRDENAS et al., 1993), já os extratos aquoso e etanólico de ramos desta espécie apresentaram efeito diurético (FERREIRA, 2008).

Figura 2 – Ilustração das partes aéreas de *Hedyosmum brasiliense*.



Fonte: Antheunisse (2016)

2.4.2.1 Óleo essencial das folhas de *H. brasiliense*

Segundo Kirchner et al. (2010), o óleo essencial das folhas apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Candida albicans* e *C. parapsilosis*. Os componentes majoritários identificados neste óleo foram o α -terpineol (10,22%), curzereno (8,93%), pinocarvona (8,39%), β -tujeno (7,09%), carotol (6,06%) e espatulenol (5,26%). Mundina et al. (2000) identificaram como compostos majoritários o sabineno (14,7%), (*E*)- β -ocimeno (10,8%), α -bisaboleno (10,3%) e terpinen-4-ol (7%). Castañeda et al. (2007) encontraram como principais componentes o sabineno (21,2%), eucaliptol (6,3%), α -pineno (5,7%), trans-4-tujanol (5,0%) e linalol (4,5%).

De acordo com Correa-Royero et al. (2010), o óleo essencial apresentou atividade citotóxica frente a células Vero, no entanto, sua constituição química não foi descrita. Vido (2009) analisou a composição química dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense*, provenientes de duas formações distintas de Mata Atlântica (Serra do Mar e da Mantiqueira), em diferentes épocas do ano e avaliou suas atividades antifúngica, antibacteriana e anticolinesterásica. Foram relatadas variações na constituição química e por consequência nas atividades biológicas contra *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4.3 *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O.Berg

A espécie *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae) (Figura 3) é encontrada nos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa e é de origem nativa, mas não endêmica do Brasil (SOBRAL, M. et al., 2015). É uma árvore de 10 a 20 m de altura e 20 a 40 cm de diâmetro, tronco reto e cilíndrico, um pouco tortuoso, casca externa profundamente fissulada em sentido longitudinal, de coloração marrom-escura (REITZ et al., 1988). Tem 108 sinónimas (“Tropicos - *Blepharocalyx salicifolius*”), sendo as mais frequentemente usadas *Blepharocalyx gigantea* e *Blepharocalyx tweediei*. É conhecida como maria-preta ou murta e é usada na medicina tradicional para o tratamento de doenças respiratórias, tosses, resfriados, hipotensão, reumatismo, hipoglicemia, diarreia, leucorréia, uretrite e infecções de bexiga (RATERA; RATERA, 1980; ALICE et al., 1991; PIVA, 2002; MITRA et al., 2007).

Extratos de *B. salicifolius* mostraram citotoxicidade contra linhagens de células cancerígenas (CALDERÓN et al., 2006), atividade sobre *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma brucei gambiense* (CHARNEAU et al., 2015), atividade antibacteriana sobre *Bacillus subtilis*, MRSA (VIVOT et al., 2012), *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis* (LUJÁN; PÉREZ CORRAL, 2008), atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* (FREIXA et al., 1998), *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum* (VIVOT et al., 2009), atividade contra o parasita *Echinococcus ortleppi* protoscoleces (NOAL et al., 2017), atividade alelopática (IMATOMI, 2010) e causaram mortalidade de larvas e diminuição da viabilidade pupal de *Microtheca ochroloma*, podendo ser empregado como um inseticida (PONCIO, 2010).

Figura 3 – Ilustração das partes aéreas de *Blepharocalyx salicifolius*.



Fonte: Antheunisse (2016)

Siqueira et al. (2010) verificaram que frações do extrato apresentaram atividade citotóxica contra células amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Posteriormente, estes autores isolaram os compostos deste extrato, que também apresentaram ação contra o mesmo parasito e, adicionalmente, ação sobre *Paracoccidioides brasiliensis*, bem como atividade frente a células tumorais (SIQUEIRA et al., 2011).

Limberger et al. (2001) realizaram ensaios com infusão de folhas secas ou frescas e não observaram atividade anti-inflamatória nem antinociceptiva, fraca atividade antiespasmódica, mas boa atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Já com

relação aos extratos de folhas jovens, o estudo de Habermann et al. (2016a) mostrou o potencial fitotóxico desta espécie.

Quanto aos frutos de *B. salicifolius*, verificou-se elevados níveis de antocianinas e capacidade antioxidante (RUFINO et al., 2010; RUFINO et al., 2011) e ainda alto conteúdo de polifenóis e ácido ascórbico (OF et al., 2016). Takao, Imatomi e Gualtieri (2015) também mostraram que o extrato das folhas desta espécie apresenta elevado conteúdo fenólico, fato este também reportado por Habermann et al. (2016b) que analisaram extratos de folhas jovens e velhas, caule e casca de *B. salicifolius*, mostrando consequente atividade antioxidante. Curiosamente no extrato desta espécie foi detectada a presença de peróxidos (SCHENKEL et al., 2002).

2.4.3.1 Óleo essencial das folhas de *B. salicifolius*

Moreira et al. (1999) identificaram como constituintes majoritários o 1,8-cineol (45,8%), (-)- β -pineno (12,3%), (+)-limoneno (7,9%). Já Costa et al. (2014), identificaram o p-cimeno (25,9%), γ -terpineno (12,5%), óxido de cariofileno + globulol (9,6%) e α -pineno (9%). Em outro estudo, análises espectroscópicas mostraram a presença de compostos com carbonilas e cetonas e os compostos majoritários identificados foram p-cimeno, α -pineno, α -terpineol, aromadendreno, globulol e óxido de cariofileno. Fato importante também foi que a sazonalidade influenciou na composição, mas não no rendimento do óleo desta planta (CASTELO et al., 2010; CASTELO et al., 2012).

Godinho (2011) verificou a ocorrência de variações qualitativas e quantitativas dos componentes majoritários do óleo essencial extraído de quatro espécimens de *B. salicifolius*, em três períodos do dia e nas quatro estações do ano. No entanto, observou a presença constante, com variações quantitativas, de quatro terpenóides (α -pineno, trans-cariofileno, espatulenol e α -humuleno) em todos os óleos essenciais analisados. Em contrapartida, Garneau et al. (2013) demonstraram que amostras obtidas de coletas em diferentes períodos do ano mantêm seu perfil qualitativo, variando somente quantitativamente. Os compostos majoritários para as amostras obtidas de coletas em setembro foram o (*E*)-nerolidol (16,1%), ledol (11,4%), α -pineno (8,3%), β -cariofileno (7,3%) e mirceno (5,5%) e em fevereiro foram o β -pineno (34%) e α -pineno (17%). Furlán et al. (2002) identificaram como componentes majoritários o α -pineno (15,8%), 1,8-cineol (14%), limoneno (13,5%), linalol (12,9%), β -pineno (11,1%) e α -terpineol (9,1%).

Talenti, Taher e Ubierno (1984) compararam a constituição química de óleos essenciais extraídos de folhas secas e frescas e verificaram que qualitativamente não há muitas diferenças, sendo os majoritários 1,8-cineol, verbenona, mirtenal, limoneno e carvona. Godinho et al. (2014) afirmaram que o perfil químico do óleo essencial obtido de espécimens coletadas do Bioma Cerrado difere daquelas coletadas nos demais biomas, sendo que, para uma espécie coletada no Cerrado, os constituintes majoritários foram o α -eudesmol (47,65%), γ -eudesmol (31,09%) e elemol (7,29%). Dellacassa et al. (1997) identificaram como majoritários o 1,8-cineol (55,7%), óxido de cariofileno (4,1%), terpine-4-ol (3,9%) e α -terpineol (3,2%).

No estudo feito por Tucker et al. (1993), foi constatada a presença majoritária de 1,8-cineol (34,5%), limoneno (17,24%), linalol (7,26%) e β -pineno (6,26%). Limberger et al. (2001) encontraram como majoritários o 1,8-cineol (25,2%), β -cariofileno (22,9%) e linalol (20,4%). O óleo essencial de partes aéreas de *B. salicifolius* apresentou efeito fungistático contra *Phyllosticta citricarpa* e a constituição química deste óleo foi predominantemente de monoterpenos (LOMBARDO et al., 2016).

Hernández et al. (2018) mostraram os efeitos antitússico, antiespasmódico, broncodilatador, e inotrópico da musculatura cardíaca, com destaque do 1,8-cineol (38,5%), limoneno (13,1%), β -pineno (9,1%), α -pineno (5,2%), linalol (4,3%), terpinen-4-ol (2,6%), α -terpineol (2,9%) e β -cariofileno (2,3%) como principais compostos deste óleo.

2.4.4 *Baccharis dracunculifolia* DC.

Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) (Figura 4) é uma espécie que habita os domínios fitogeográficos do Cerrado, Mata Atlântica e Pampa, sendo nativa, mas não endêmica do Brasil (HEIDEN; SCHNEIDER, 2015). Apresenta-se na forma de arbustos ramificados, com até 3 metros de altura (BARROSO, 1976) e é considerada a principal fonte botânica da própolis verde (PARK et al., 2004). É conhecida popularmente como Alecrim-do-Campo ou Vassoura e é usada na medicina tradicional como antipirético, para problemas estomacais e como um tônico (FUKUDA et al., 2006).

Têm sido comprovadas várias atividades biológicas dos extratos e compostos isolados desta espécie, dentre elas, atividades contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (DA SILVA FILHO et al., 2004), sobre *Leishmania donovani* e *L. amazonensis* (FILHO et al., 2009; JOHANN et al., 2012), antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e antibacteriana sobre *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* (JOHANN et al., 2007; DA SILVA FILHO et al., 2008; DIAZ et al., 2010; JOHANN et al., 2010; FABRI et al., 2011; BONETT et al., 2012; JOHANN et al., 2012; SILVA et al., 2012) e *Streptococcus mutans* (LEITÃO et al., 2004).

Extratos e isolados de *B. dracunculifolia* ainda mostraram ação sobre a formação de biofilme dental (PEDRAZZI et al., 2015), ação mutagênica quando em altas concentrações, mas efeitos quimiopreventivos contra danos cromossômicos em baixas concentrações (RESENDE et al., 2007; ANDRADE; PERAZZO; MAISTRO, 2008; MUNARI et al., 2008, 2010; RESENDE et al., 2012; ROBERTO et al., 2016). São também relatadas propriedades hepatoprotetoras (REZENDE et al., 2014), imunomodulatória, anti-inflamatória e antinociceptiva (MISSIMA et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2010; CESTARI et al., 2011; BACHIEGA et al., 2013; MALDANER et al., 2015), além de propriedades antioxidantes e preventivas com relação a danos oxidativos na mitocôndria (FABRI et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012; MARTINEZ-CORREA et al., 2012; REZENDE et al., 2014; PAROUL et al., 2016).

Figura 4 – Ilustração das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*.



Fonte: adaptado de Schossler et al. (2009)

Esta espécie vegetal é ainda eficaz no tratamento de úlcera gástrica (LEMOS et al., 2007), apresenta propriedades alelopáticas (GUSMAN; BITTENCOURT; VESTENA, 2008; IBANEZ; ZOPPOLO, 2011), atividade antipoliiovirus (BÚFALO et al., 2009), bem como efeito citotóxico contra células de linhagens cancerígenas: melanoma (UACC-62; B16F10), mama (MCF-7), renal (TK-10), fígado (HepG2), glioblastoma (U343), leucêmicas (L 1210) e de laringe (HEp-2)

(FUKUDA et al., 2006; BÚFALO et al., 2010; JOHANN et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2014). Akao et al. (2003) reportaram também que artepelin C, bacarina e drupanina, compostos presentes tanto na própolis quanto em *B. dracunculifolia*, exibiram propriedades antitumorais.

2.4.4.1 Óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia*

Klopell et al. (2007) revelaram a atividade antiulcerogênica do óleo essencial e do nerolidol (23,6%), composto majoritário deste óleo. Posteriormente, Massignani et al. (2009) confirmaram esta mesma ação e identificaram como compostos majoritários o nerolidol (23,58%), germancreno-D (21,54%), biclogermacreno (19,24%), trans-cariofileno (7,12%) e espatulenol (6,03%).

Parreira et al. (2010) encontraram como constituintes majoritários o (*E*)-nerolidol (33,51%) e espatulenol (16,24%), sendo este óleo ativo contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* e contra *Schistosoma mansoni*, porém inativo frente à *Plasmodium falciparum* e não citotóxico com relação à células Vero.

Frizzo et al. (2008) compararam o óleo essencial de amostras de *B. dracunculifolia* coletadas no Brasil, Bolívia e Uruguai e verificaram diferenças quantitativas e qualitativas na constituição química, sendo que no óleo essencial das espécies brasileiras houve elevado conteúdo de (*E*)-nerolidol, composto ausente ou presente em baixas quantidades no óleo essencial de *B. dracunculifolia* da Bolívia ou Uruguai.

Pereira et al. (2011) mostraram que o óleo essencial foi ativo contra 51 isolados de *Candida*, dentre eles, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sendo alguns inclusive resistentes a agentes antifúngicos comerciais. Bonett et al. (2012) mostraram atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*, o agente causal da antracnose. Fonseca et al. (2015) destacaram o potencial do óleo essencial no controle de fitopatógenos, atuando sobre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia minor*.

Queiroga, Fukai e Marsaioli (1990) fizeram análise do óleo essencial por várias técnicas e destacaram-se como majoritários o nerolidol e espatulenol. Queiroga et al. (2008) mostraram ainda que o tempo de extração influencia quantitativamente e que a fração de hidrolatos pode conter compostos importantes como o espatulenol, (*E,E*)-farnesol e (*E*)-nerolidol. Búfalo et al. (2009, 2010) também identificaram como constituintes majoritários o nerolidol e espatulenol e

ainda mostraram certa atividade antipoliiovirus e atividade citotóxica frente à células de carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2).

Quanto ao método de extração dos óleos essenciais para esta planta, Cassel et al. (2000) mostraram que a extração por CO₂ supercrítico é mais eficiente quando comparada à hidrodestilação para a obtenção de nerolidol e espatulenol, compostos de importância comercial. Já Schossler et al. (2009), compararam o processo de extração por hidrodestilação com microextração por fase sólida (HS-SPME) e mostraram que alguns compostos somente foram detectados quando a extração foi feita por HS-SPME.

Sousa et al. (2009) fizeram a análise sazonal de espécies cultivadas em 10 regiões diferentes e observaram que o E-nerolidol e espatulenol foram os componentes majoritários durante todo o ano. Boix et al. (2010), pelo método de extração e destilação simultâneas, identificaram como componentes majoritários a cânfora (25,2%), 1,8-cineol (10,4%), mirceno (10,2%), verbenona (10,1%) e α -pineno (4,8%).

Ferronato et al. (2007) mostraram a atividade inibidora sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de difusão em disco. Marchesan et al. (2006) destacaram a ação deste óleo na inibição da enzima hialuronidase. O óleo essencial foi investigado contra espécies de *Mycobacterium*, mas não apresentou atividade relevante (MACHADO et al., 2015).

Silva et al. (2012) identificaram como compostos majoritários o nerolidol (18,77%), germacreno D (10,45%) e limoneno (8,75%) e mostraram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pelo método de diluição em ágar.

Na análise feita por Galvão et al. (2012) foi constatada a presença majoritária de trans-nerolidol (31,7%), espatulenol (13,6%) e trans-cariofileno (10,7%), apresentando este óleo efeito bacteriostático contra *Streptococcus mutans* e efeito inibitório com relação à formação de biofilme e com relação ao crescimento de células tumorais (Glioma -U251 e Ovariana-OVCAR-3).

Aires et al. (2016) testaram um enxaguante bucal feito à base de óleo essencial de *B. dracunculifolia* e observaram que este foi capaz de alterar a composição química do biofilme formado por *S. mutans*, o que pode ter um grande impacto nas propriedades cariogênicas desta bactéria.

Para o óleo essencial obtido de uma amostra da Bolívia, Loayza et al. (1995) encontraram como constituintes majoritários o β -pineno (17,23%), δ -cadineno (12,97%) e germacreno-D (7,29%).

Ferracini et al. (1996) observaram que há diferenças quantitativas entre óleo essencial de plantas macho e fêmea, sendo os compostos majoritários o nerolidol, β -selineno e β -cariofileno. Lage et al. (2015) mostraram atividade do óleo essencial, e seu composto majoritário nerolidol, contra larvas de *Rhipicephalus microplus*. Os componentes majoritários identificados foram o nerolidol (22,3%), germacreno- D (7,2%), limoneno (6,9%), β -pineno (6,7%) e biciclogermacreno (6,5%). Os compostos majoritários identificados por Missima et al. (2007) foram o β -pineno (27,45%), (*E*)-nerolidol (14,02%), limoneno (10,67%) e espatulenol (9,54%). Já Lago et al. (2008), encontraram β -elemeno (53,31%) e fenil propanoato de etila (7,83%) como principais constituintes deste óleo. Miranda et al. (2015) destacaram o limoneno (30,9%), o trans-nerolidol (22,4%) e o β -pineno (14,5%) como majoritários. Estes mesmos autores ainda mostraram que este óleo não apresentou atividade antioxidante significativa e, pelo método de difusão em ágar, não teve ação sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mas apresentou ação antibacteriana contra *Salmonella cholerasuis* e *Listeria monocytogenes*. Em contrapartida, Ferronato et al. (2006) mostraram ação antioxidante deste óleo essencial.

Paroul et al. (2016) mostraram que o extrato aquoso desta espécie apresentou atividade antioxidante 100 vezes maior comparado à ação do seu óleo essencial, que possui majoritariamente germacreno D (27,38%), biciclogermacreno (20,29%), α -cariofileno (16,33%) e germacreno A (11,16%). Florão et al. (2012) mostrou ação anti-inflamatória deste óleo, sendo o espatulenol (47,9%) o componente majoritário. Martinez-Correa et al. (2012) identificaram na fração volátil de extratos de *B. dracunculifolia* o germacreno D (12,99% / 8,79%), γ -elemeno (11,49%), trans-cariofileno (6,81% / 7,71%), nerolidol (5,73% / 6,50%) e espatulenol (3,81% / 4,55%).

2.4.5 *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez

Nectandra megapotamica (Lauraceae) (Figura 5) é uma espécie nativa, mas não endêmica do Brasil e é encontrada nos domínios fitogeográficos de Cerrado e Mata Atlântica (QUINET et al., 2014). É uma espécie arbórea, conhecida popularmente como canela-louro, canela-preta, canela-ferrugem e canela-fedorenta (LORENZI, 2002). Tem várias sinônimas, e um nome também aceito para esta espécie é *Nectandra angustifolia* ("Tropicos - *Nectandra*

megapotamica”). Com relação ao uso etnofarmacológico, o chá da folha é empregado como calmante e no tratamento de tosse e gripes e a casca para o tratamento de furúnculos. Foram observadas atividade tripanocida (*Trypanosoma cruzi*), citotóxica contra células tumorais de leucemia (HL-60), analgésica, anti-inflamatória e leishmanicida (*Leishmania donovani*) de lignanas tetrahidrofurânicas isoladas desta espécie (DA SILVA FILHO et al., 2004a,b; DA SILVA FILHO et al., 2008; PONCI et al., 2015).

Compostos isolados desta espécie apresentaram ainda atividade antioxidante e antifúngica sobre cepas do gênero *Candida* e *Cryptococcus* (GARCEZ et al., 2009). Wu et al. (2006) mostraram que o extrato bruto apresentou atividade citotóxica frente a células tumorais humanas (Hep G2 e MDA-MB-231) e atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Chinchilla-Carmona et al. (2011) mostraram atividade antimalárica do extrato da raiz contra *Plasmodium berghei*. Torres et al. (2011) mostraram que o extrato desta espécie apresenta efeito inibitório sobre o veneno de *Bothrops neuwiedi diporus* (ALVES et al., 2008).

Figura 5 – Ilustração das partes aéreas de *Nectandra megapotamica*.



Fonte: adaptado de Zanon, Goldenberg e Moraes (2009)

Em uma triagem microbiológica feito com diferentes extratos de folhas de *N. megapotamica*, Barneche et al. (2010) mostraram ação contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Ferraz (2015) mostrou que cascas e folhas de *N.*

megapotamica apresentam maior conteúdo de fenóis e flavonoides quando comparado a duas outras espécies do mesmo gênero, *N. lanceolata* e *N. grandiflora*.

2.4.5.1 Óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*

Com relação aos óleos essenciais, Romoff et al. (2010) mostraram a presença majoritária de δ -elemeno e α -bisabolol nos óleos essenciais obtidos de folhas coletadas em meses e períodos diferentes do dia, observando-se somente uma variação quantitativa. Já Reis e Apel (2013) mostraram uma variação qualitativa e quantitativa onde, para coleta de folhas feita no mês de julho, destacaram-se como constituintes majoritários o biciclogermacreno (39,7%) e germacreno D (24,9%), e para coleta feita em abril, os majoritários foram o espatulenol (25,6%), beta-selineno (11,7%) e biciclogermacreno (7,7%). Estes autores observaram ainda maior efeito antioxidante do óleo essencial obtido das folhas coletadas em julho. Amaral et al. (2015) também analisaram a influencia da sazonalidade comparando folhas jovens e velhas e os componentes majoritários foram sempre o α -pineno, biciclogermacreno, β -pineno, germacreno D e limoneno, variando suas concentrações quando se compara os períodos de coleta e tipo de folha.

Tondolo et al. (2013) estudaram o potencial anestésico do óleo essencial das folhas em robalos-peva (*Centropomus parallelus*) e comprovaram eficiência na indução da sedação e anestesia. Neste estudo, os óleos essenciais foram extraídos de folhas jovens e velhas separadamente, sendo encontrados como majoritários o biciclogermacreno (46,5%/34,6%), α -pineno (26,8%/26,2%), β -pineno (7,9%/12,3%) e germacreno D (9,6%/9,1%). Torres et al. (2005) descreveram como majoritários o p-menta-1(7), 8-dieno (25,2%), α -terpinoleno (20,9%), δ -elemeno (6,8%) e germacreno D (5,2%).

Apel et al. (2006) comprovaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, ação anti-inflamatória e antitumoral contra células de carcinoma prostático e mieloma múltiplo, mas não descreveram a constituição química deste óleo.

Brito (2009) investigou a diferença da constituição química obtida de óleos essenciais de folhas coletadas de 3 indivíduos diferentes e observou que entre 2 deles a constituição era semelhante, sendo os majoritários α -santaleno (17,42%), trans α -bergamoteno (7,63%), β -santaleno (9,23%), γ -amorfeno (8,42%), biciclogermacreno (6,25%) e alohimachalol (7,47%) e no terceiro indivíduo, predominaram o muurola 4 10 (14) dien-1- β -ol (23,09%) e δ -elemeno (11,16%). Neste estudo, a variação qualitativa dos constituintes entre os indivíduos diferentes

foi maior que a observada em decorrência da sazonalidade. Diferente do que foi observado por Apel et al. (2006), o estudo de Brito (2009) mostrou não haver atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* e pouca atividade frente à *Staphylococcus aureus* além de nenhuma atividade contra *Escherichia coli*, *Cyperus sphaerospermus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*.

Torres et al. (2014) mostraram atividade do óleo essencial contra o veneno de *Bothrops diporus*, sendo os constituintes majoritários biciclogermacreno, germacreno D, α -pineno, β -pineno, limoneno e (E)-asarona, com concentrações variando dependendo da época do ano em que foram coletadas as folhas. Silva et al. (2014) testaram o óleo da folha desta espécie contra larvas de Coenagrionidae, entretanto não foi observado efeito promissor.

Amaral et al. (2015) mostraram não haver diferenças na constituição química de óleos essenciais extraídos de folhas jovens e velhas, sendo os compostos majoritários biciclogermacreno, α -pineno, β -pineno, germacreno D e limoneno, quantitativamente variando dependendo da época de coleta. Wu et al. (2006) encontraram como constituintes majoritários o α -pineno (22,4%), γ -cadineno (14,1%), β -pineno (12,6%), α -copaeno (12,5%), germacreno D (6,9%), α -humuleno (5,6%) e β -cariofileno (5,5%).

Werka et al. (2007) mostraram a letalidade deste óleo frente à *Artemia salina*, mas não verificaram atividade interessante sobre a inibição de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Por outro lado, Ferraz (2015), mostrou que o óleo essencial foi ativo para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, apresentando a seguinte constituição majoritária com variações quantitativas sazonais: α -pineno, β -pineno, α -felandreno, limoneno, α -cubebeno, biciclogermacreno e espatulenol.

Marin et al. (2009) encontraram como majoritários E-nerolidol (17,2%), β -cariofileno (16,8%), espatulenol (13,7%) e óxido de cariofileno (10,7%). Sturnich e Silva (2014; 2016) mostraram atividade antioxidante, sendo os constituintes majoritários o β -elemeno, 13-hidroxi valenceno, cariofileno e globulol.

Oliveira et al. (2017) isolaram cinco sesquiterpenóides do óleo essencial de *N. megapotamica* e alguns destes apresentaram atividade antimicrobiana relevante contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

3 Objetivos

Objetivo geral:

Analisar os óleos essenciais de folhas das espécies *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, *B. dracunculifolia* e *N. megapotamica* quanto ao seu potencial de uso na elaboração de fármacos para tratamento de doenças de impacto em saúde pública.

Objetivos específicos:

a) Identificar e quantificar os constituintes voláteis dos óleos essenciais das folhas das espécies em questão e estabelecer, por meio de análises estatísticas, uma relação entre tais constituintes e atividades biológicas encontradas;

b) Avaliar as atividades citotóxicas destes óleos essenciais contra as linhagens de células tumorais Ehrlich, MCF-7, MDA-MB-231 e a linhagem normal MCF-10A; Verificar os mecanismos de morte celular por citometria de fluxo;

c) Avaliar as atividades antileishmania destes óleos voláteis contra *L. amazonensis*;

d) Avaliar as atividades antifúngicas dos óleos essenciais frente a espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis* e os dermatófitos *T. mentagrophytes* e *M. canis*;

b) Avaliar a atividade antibacteriana contra microrganismos Gram positivos (*S. aureus* metilicina resistente (MRSA) e metilicina sensível (MSSA)) e Gram negativos (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e adicionalmente verificar a ação sinérgica entre os óleos essenciais e drogas antimicrobianas convencionais.

4 Material e Métodos

4.1 Preparação do material vegetal e extração dos óleos essenciais

Folhas de *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, *B. dracunculifolia* e *N. megapotamica* foram coletadas na primavera, durante o período da manhã, em áreas do município de Botucatu-SP, sendo o material vegetal identificado por especialistas e as exsicatas depositadas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU), com os respectivos números de registro: 71036; 72088; 71037; 71038; 71035. Para fins de pesquisa científica das espécies em estudo, uma autorização de acesso ao patrimônio genético (nº 010621/2015-6) foi obtida junto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O processamento do material vegetal foi feito no laboratório de Bacteriologia e Produtos Naturais no Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBB, UNESP, Botucatu. Os óleos essenciais foram obtidos por destilação de folhas frescas por arraste de vapor durante um período de 2 horas usando-se um destilador modelo MA480 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Os óleos essenciais foram separados da água por decantação, estocados a baixas temperaturas (-10 °C) e protegidos da luz até as análises. A porcentagem de rendimento foi calculada relativa à massa seca da amostra inicial para análises realizadas em triplicata, de acordo com a equação (CASTELO et al., 2010):

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do óleo}}{\text{massa de folhas secas}} \times 100$$

4.2 Caracterização química

4.2.1 Análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os óleos essenciais foram analisados utilizando um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas modelo FOCUS ISQ 230ST (Thermo Scientific, Austin, Texas, EUA), equipado com uma coluna capilar TraceGOLD TG-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm de espessura de filme, Thermo Scientific) sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi, Departamento de Farmacologia do IBB, UNESP, Botucatu. O gás carreador foi o hélio a um fluxo de 1 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 240 °C respectivamente. O volume de injeção foi de 1 µL na concentração de 0,01 mg mL⁻¹ no modo split. A rampa de

aquecimento foi de 60 a 246 °C (3 °C min⁻¹). O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram registrados os fragmentos de 40 a 415 m/z (ADAMS, 2007).

A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada por comparação do espectro de massas obtido, com aqueles disponíveis na biblioteca do software (Nist08) e também pela comparação entre o índice aritmético calculado (IA) e o índice reportado na literatura (“NIST Livro de Química na Web”; ADAMS, 2007). O IA foi calculado de acordo com a equação, proposta por Van Den Dool e Kratz (1963):

$$IA(X) = 100 \times PzC + 100 \times \frac{t(X) - t(Pz)}{t(Pz+1) - t(Pz)}$$

Onde:

x = composto no momento t;

t (x)= tempo de retenção do composto em análise;

Pz = alcano antes de x;

t (Pz)= tempo de retenção do alcano antes de x;

Pz + 1 = alcano depois de x;

t (Pz+1)= tempo de retenção do alcano depois de x.

Este cálculo foi baseado nos tempos de retenção de padrões de alcanos lineares (C8-C40, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), injetados nas mesmas condições das amostras (apêndice A).

Análises quantitativas foram realizadas em triplicata por CG-EM e quantidades de compostos voláteis foram calculados usando-se o método do padrão interno, levando-se em conta o fator de resposta relativo (FRR), de acordo com as seguintes equações (IOFI working group on methods of analysis, 2011):

$$FRR = \frac{Aa1}{Ais} \times \frac{mis}{ma1} \qquad ma2 = \frac{Aa2}{Ais} \times \frac{mis}{FRR}$$

Onde:

FRR= Fator de resposta relativo;

ma2= massa do analito na amostra do óleo essencial

Aa1= área do padrão;

Aa2= área do analito.

Ais= área do padrão interno;

mis= massa do padrão interno;

ma1= massa do padrão;

Para este propósito, heptanal (Sigma-Aldrich; 0,0092 mg mL⁻¹) foi selecionado como padrão interno. Os padrões felandreno, linalol, cariofileno e nerolidol (Sigma-Aldrich) foram selecionados para representar os fatores de resposta de monoterpênos não oxigenados, monoterpênos oxigenados, sesquiterpênos não oxigenados e sesquiterpênos oxigenados respectivamente. Análises para o cálculo do FRR foram realizadas cinco vezes em quatro

concentrações diferentes (0,0104; 0,0146; 0,0187; 0,0229 mg mL⁻¹), sendo os resultados expressos como a média dos fatores de resposta.

4.3 Atividades biológicas

4.3.1 Atividade citotóxica

A determinação da citotoxicidade é um procedimento importante na busca de substâncias antiproliferativas contra células anormais. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados (DE ANGELIS et al., 1986; RIDDELL; CLOTHIER; BALLS, 1986; SAOTOME; MORITA; UMEDA, 1989; SASAKI et al., 1991; HUSOY; SYVERSEN; JENSSEN, 1993). A partir de ensaios *in vitro*, é possível calcular a concentração que determina 50% de viabilidade celular (CC₅₀) e, por avaliações com linhagens celulares normais, determinar a seletividade do produto frente a células anormais.

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Tripanosomatídeos na Universidade Federal de Uberlândia, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva. Amostras dos óleos essenciais foram solubilizadas em metanol (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e diluídas em meio Dulbecco's Modified Eagle suplementado (DMEM; Sigma-Aldrich), obtendo-se assim uma solução estoque de 640 µg mL⁻¹.

O teste de viabilidade celular foi realizado com células da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). As linhagens de Ehrlich (carcinoma de mama murino; ATCC CCL-77), MCF-7 (carcinoma de mama humana, estrógeno receptor positiva; ATCC HTB-22), MDA-MB-231 (carcinoma de mama humana, estrógeno receptor negativa; ATCC HTB-26) e MCF-10A (epiteliais normais de mama humana; ATCC CRL-10317) foram selecionadas para os ensaios de citotoxicidade.

Uma solução contendo 1×10^4 células em 100 µL de DMEM suplementado com insulina, fatores específicos de crescimento, hidrocortisona e soro fetal bovino foi pipetada em cada poço e então a placa foi incubada overnight a 37 °C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂, o que permitiu a adesão das células aos poços. Após a adesão, o meio de cultura foi removido, a solução estoque de óleo essencial foi adicionada na microplaca e foi feita a diluição seriada, alcançando concentrações que variaram de 4 a 512 µg mL⁻¹.

Foram feitos controles de crescimento celular, solvente (metanol 3%), das amostras e controle negativo (100% de células lisadas). Após o tratamento, as microplacas foram incubadas por 48h a 37 °C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Posteriormente, uma solução reveladora de resazurina (3 mM), diluída em tampão fosfato (PBS) foi adicionada em cada poço (ROLÓN et al., 2006) e as placas foram incubadas novamente por 24h nas mesmas condições. Foram realizadas leituras de absorvância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca Multiskan GO (Thermo Scientific). Análises foram realizadas em seis replicatas e os resultados de absorvância foram calculados de acordo com os controles de crescimento.

A concentração citotóxica na qual 50% das células são viáveis (CC₅₀) foi calculada por um gráfico dose-resposta de regressão não-linear. Com o intuito de se verificar a especificidade, uma relação entre linhagem celular de mama normal e linhagens cancerígenas de mama foi estabelecida pelo índice de seletividade (IS), calculado de acordo com a equação adaptada de Case et al. (2006):

$$IS = \log \frac{CC50 \text{ MCF} - 10A \text{ (célula de mama normal)}}{CC50 \text{ (célula tumoral de mama)}}$$

4.3.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo

A apoptose e necrose foram avaliadas através de um kit (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Para esta análise, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foram selecionadas com base nos ensaios de citotoxicidade. Uma solução contendo 5x10⁵ células foi semeada por poço em placas de 6 poços e tratadas durante 48h a 37 °C com os óleos essenciais na dose de CC₅₀ previamente determinada pelo ensaio de atividade citotóxica. Após incubação a 37 °C com atmosfera umidificada e 5% de CO₂, as células aderidas foram tripsinizadas, lavadas com PBS, ressuspensas no tampão do kit, marcadas com anexina V conjugada com FITC (ficoeritrina) e iodeto de propídio (PI) e incubadas no escuro durante 30 minutos. A detecção da porcentagem de células em apoptose e necrose foi determinada em citômetro de fluxo CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, EUA) em comprimento de onda de excitação de 488nm para o PI e 530nm para o FITC, utilizando o software Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, EUA). Os marcadores foram padronizados para a realização dos experimentos que foram realizados em triplicada e um total de dez mil eventos foram coletados para cada amostra.

4.3.3 Atividade antileishmania

O método de microdiluição em caldo é considerado a melhor opção, comparado a diferentes técnicas mais comumente utilizadas nos laboratórios para avaliação de atividades biológicas (ALVES et al., 2008). Complementarmente, o ensaio colorimétrico da resazurina é um método que pode ser aplicado para testar a viabilidade em formas promastigotas de *Leishmania* sp. Este ensaio é baseado na habilidade dos parasitos viáveis de reduzirem a resazurina (azul) em resorufina (rosa) e, portanto o efeito da droga pode ser quantificado fotometricamente (MIKUS; STEVERDING, 2000). O ensaio da resazurina é um método simples, reproduzível e confiável para o screening de drogas antileishmania (MIKUS; STEVERDING, 2000).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Tripanosomatídeos na Universidade Federal de Uberlândia, com a colaboração do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva. Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivados e mantidos a 26 °C em meio Brain Heart Infusion (BHI; Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 mg de gentamicina/mL e 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, Nova York, NY, EUA).

Os óleos essenciais foram solubilizados em metanol (Synth) e diluídos em caldo BHI (Difco), obtendo-se uma solução estoque de 1280 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em placas de 96 poços e então as soluções estoque dos óleos essenciais foram adicionadas na microplaca e foram feitas diluições seriadas, alcançando concentrações que variaram de 8 a 1024 µg mL⁻¹, não excedendo 3% para concentração de metanol.

Foram realizados ensaios controles do parasita sem tratamento, do solvente (metanol 3%), das amostras, do meio e controle positivo, na qual a droga padrão Anfotericina B (Sigma-Aldrich) foi utilizada. Uma solução contendo 1×10^6 parasitas em 20 µL de BHI foi pipetada em cada poço e as placas foram incubadas por 48h a 25 °C. Posteriormente, uma solução reveladora de resazurina (3 mM), diluída em PBS, foi adicionada em cada poço (ROLÓN et al., 2006) e novamente incubada por 24h a 25 °C. Após a incubação, foram realizadas leituras de absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca Multiskan GO (Thermo Scientific). Análises foram realizadas em seis replicatas e os resultados de absorbância foram calculados de acordo com os controles de crescimento.

A concentração que causa 50% de inibição do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀) foi calculada por um gráfico dose-resposta de regressão não-linear. Adicionalmente, um

teste de citotoxicidade contra macrófagos, uma das principais células hospedeiras de *L. amazonensis*, foi realizado. Macrófagos imortalizados diferenciados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram utilizados nesta análise e o teste de citotoxicidade foi realizado conforme já descrito na seção 4.3.1 Atividade citotóxica.

4.3.4 Atividade antifúngica

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Biologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP – Campus de Botucatu) com a colaboração do Prof. Dr. Eduardo Bagagli, sendo este laboratório o fornecedor das cepas ATCC e isolados clínicos. Os isolados clínicos foram molecularmente identificados e depositados no banco de dados do genbank, National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os seguintes organismos foram usados para avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais: *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida albicans* (ATCC 36801), *Candida guilliermondii* (ATCC 22017), *Candida parapsilosis* (ATCC 90018), *Candida orthopsilosis* (ATCC 96141), *Candida metapsilosis* (ATCC 96142), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012), *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa TLM17LM2, número de acesso no genbank: KX774393, forma leveduriforme), *Microsporium canis* (cepa RS5, número de acesso no genbank: KT443098) and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 11480).

O ensaio de microdiluição em caldo para fungos filamentosos e leveduriformes foi realizado como recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002a,b) com algumas adaptações. Ensaio foram realizados em placas de 96 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) com RPMI-1640 suplementado com glutamina sem bicarbonato de sódio (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Amostras dos óleos essenciais foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, SP, Brasil) e diluições seriadas foram realizadas obtendo-se concentrações que variaram de 2,44 a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para o ajuste de inóculo das formas leveduriformes (*Candida* spp., *C. neoformans*, *P. brasiliensis*), foram feitas contagens em câmara de Neubauer (Knittel Gläser, Braunschweig, LS, Alemanha) a partir do crescimento inicial em meio RPMI-1640 para alcançar uma concentração final de $1,2 \times 10^3$ células mL^{-1} . Para se obter este crescimento inicial, *Candida* spp. foram incubadas a 37 °C por 48h, *C. neoformans* a 37 °C por 72h e *P. brasiliensis* a 35 °C por 10 dias. Os fungos filamentosos *M. canis* and *T. mentagrophytes* foram cultivados em ágar batata dextrose (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) por 7 dias a 25 °C. Contagem de células na câmara

de Neubauer também foi realizada e uma concentração final de 2×10^4 células mL^{-1} foram inoculadas nas microplacas.

As placas foram incubadas em atmosfera úmida, com agitação a 37°C por 48h para *Candida* spp. e 72h para *C. neoformans*. *P. brasiliensis* foi incubada por 14 dias a 35°C com agitação e *M. canis* e *T. mentagrophytes* por 10 dias a 25°C sem agitação. O experimento foi realizado em seis replicatas e a inibição do crescimento foi determinada pela medida de turbidez do meio de cultura a 530 nm usando um espectrofotômetro (BioTek, Winooski, VT, EUA). Anfotericina B (Sigma-Aldrich) foi utilizada como controle positivo. Foram feitos controles de esterilidade do caldo, controle do inóculo, dos óleos essenciais e do DMSO (3%).

4.3.5 Atividade antibacteriana

Experimentos foram realizados com cepas padrão ATCC e isolados clínicos de mesma espécie (n=6) obtidos do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP – Campus de Botucatu). O uso de microrganismos isolados foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CAAE: 47186415.0.0000.5411). Os seguintes microrganismos foram utilizados: *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) (ATCC 33591), *Staphylococcus aureus* meticilina-sensível (MSSA) (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Ensaio de susceptibilidade foram realizados de acordo com as normas do CLSI (2014) em placas de 96 poços (Costar) e em meio de cultura Mueller Hinton (Difco). Amostras dos óleos essenciais foram dissolvidas em DMSO (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e diluições seriadas foram realizadas para alcançar concentrações entre 2,44 e $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cepas bacterianas foram cultivadas a 37°C por 24h em caldo BHI (Difco) e após a padronização na escala 0,5 McFarland, foram inoculados cerca de 10^5 ufc mL^{-1} nos poços contendo o óleo essencial nas concentrações seriadas. Após incubação a 37°C por 24h, a concentração inibitória mínima (CIM) para cada cepa foi visualizada após a adição de 50 μL de resazurina (0,01%). Polimixina B (Latinofarma, Cotia, SP, Brasil) foi usada como controle positivo para bactérias Gram-negativas e Cefalotina (Latinofarma) para o controle das Gram-positivas. Foram feitos controles de esterilidade do caldo, controle do inóculo, controles dos óleos essenciais e do DMSO (3%).

4.3.6 Sinergismo com drogas antibacterianas

Após a realização dos ensaios de microdiluição para obtenção dos valores de CIM, foram realizados ensaios para obtenção das curvas de sobrevivência, com o intuito de verificar a interação sinérgica entre drogas convencionais e óleos essenciais usados contra as bactérias avaliadas neste estudo.

Os microrganismos verificados foram *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA) (ATCC 33591), *Staphylococcus aureus* metilina-sensível (MSSA) (ATCC 25923) com as drogas Cefalotina, Vancomicina e Oxacilina e *Escherichia coli* (ATCC 43895) com as drogas Cefalotina, Polimixina e Gentamicina combinadas aos óleos essenciais de *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, *B. dracunculifolia* e *N. megapotamica*.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços (Costar) e em meio de cultura Mueller Hinton (Difco). Amostras dos óleos essenciais foram previamente dissolvidas em DMSO (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e diluídas de modo que a concentração final de DMSO na placa não ultrapassasse 3%. As drogas foram testadas isoladamente na proporção de $\frac{1}{4}$ da CIM e em combinação com os óleos essenciais nas proporções de $\frac{1}{4}$ da CIM obtida para cada óleo essencial com $\frac{1}{4}$ da CIM obtida para cada droga. As Cepas bacterianas foram previamente cultivadas à 37 °C por 24h em caldo BHI (Difco) e após a padronização na escala 0,5 McFarland, foram inoculados cerca de 10^5 ufc mL⁻¹ em cada poço. As análises foram realizadas em triplicata e leituras foram feitas em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, VT, EUA) à 530 nm nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas com incubação à 37 °C. Após o período experimental, foi feito o plaqueamento para comprovação de efeito bactericida ou bacteriostático.

4.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey para análise de atividade citotóxica e antiparasitária e teste de Kruskal-Wallis seguido por Student-Newman-Keuls para análises de concentração inibitória mínima contra os microrganismos usando o programa SigmaPlot 11.0. A análise estatística para dados da citometria de fluxo foi realizada pelo teste Two-Way ANOVA seguido por teste Sidak, usando o software GraphPad Prism 6.01. Análises de correlação foram feitas entre a concentração dos dez componentes majoritários de todos os óleos essenciais e as atividades biológicas avaliadas através do programa XLSTAT.

5 Resultados e Discussão

5.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais

A densidade e rendimento dos óleos essenciais de folhas das espécies em análise estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Densidade (g mL^{-1}) e rendimento (%) dos óleos essenciais de folhas de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica*.

Espécies	Densidade (g mL^{-1})	*Rendimento (%)
<i>P. heptaphyllum</i>	0,79	0,28
<i>H. brasiliense</i>	0,88	0,058
<i>B. salicifolius</i>	0,88	0,86
<i>B. dracunculifolia</i>	0,87	0,89
<i>N. megapotamica</i>	0,74	0,17

* Relativo à massa de folhas secas.

B. salicifolius e *B. dracunculifolia* apresentaram alto rendimento em comparação aos óleos essenciais de *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense* e *N. megapotamica*. Este alto rendimento é equivalente ao de óleos essenciais já explorados comercialmente tais como manjerição (1,24%) e tomilho (1,05%) (LEE et al., 2005) e ainda *Eucalyptus citriodora* (1,05%) (ZRIRA et al., 1992).

Na Tabela 2 estão apresentados os fatores de resposta relativos (FRR) de diferentes grupos químicos usados para calcular a concentração aproximada de cada composto dos óleos essenciais.

De acordo com as análises químicas, 22 compostos foram identificados em *P. heptaphyllum* e monoterpenos não oxigenados foram predominantes no óleo essencial das folhas desta espécie (Tabela 3). Os compostos majoritários identificados foram o α -felandreno (33,41%), isoterpinoleno (25,08%), (*E*)-cariofileno (7,88%), β -felandreno (6,12%) e α -tujeno (5,32%). Comparando-se aos compostos majoritários encontrados por outros autores, o (*E*)-cariofileno é o componente mais frequente no óleo das folhas desta espécie (Figura 6) (ZOGHBI; MAIA; LUZ, 1995; BANDEIRA et al., 2001; CITÓ; COSTA; LOPES, 2006; TAFURT-GARCÍA; MUÑOZ-ACEVEDO, 2012; DE CARVALHO et al., 2013), sendo também encontrado como majoritário no presente trabalho. O β -felandreno também já foi identificado por Pontes et al. (2007) e o α -felandreno por Araújo et al. (2011). O isoterpinoleno e o α -tujeno estão sendo descritos aqui pela primeira vez como compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum*.

Tabela 2: Medidas de fatores de resposta relativos (FRR) para diferentes grupos químicos

Compostos	FRR (Média ± DP)
<i>Monoterpeno não Oxigenado</i>	
Felandreno	1,05 ± 0,04
<i>Monoterpeno Oxigenado</i>	
Linalol	1,53 ± 0,16
<i>Sesquiterpeno não Oxigenado</i>	
Cariofileno	2,27 ± 0,05
<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>	
Nerolidol	0,49 ± 0,09

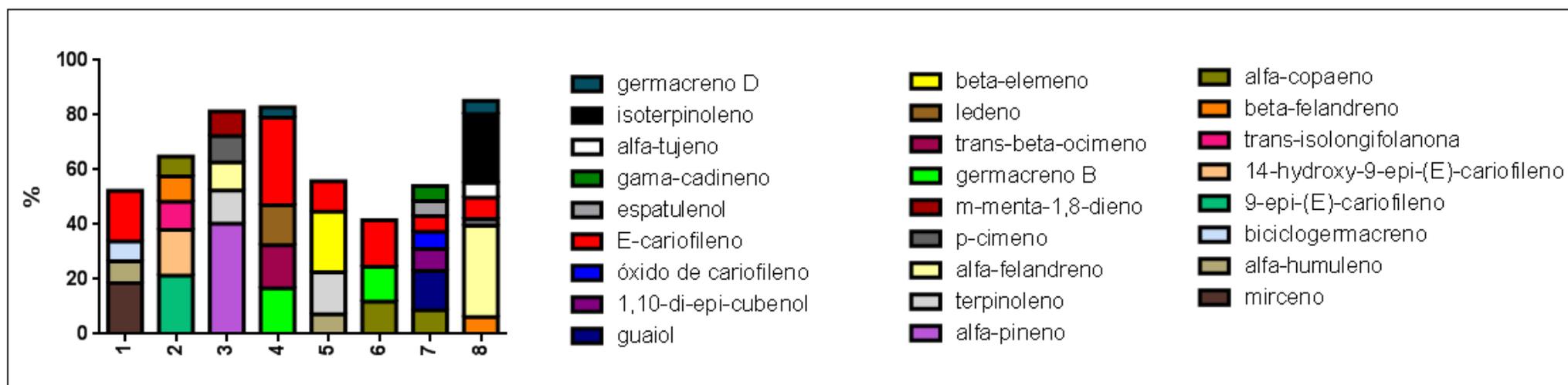
DP: Desvio padrão

Tabela 3: Composição química do óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum*.

Composto	TR	IA Ref.	IA Calc.	FRR	Concentração* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%
<i>Monoterpeno não Oxigenado</i>						
α -Tujeno	6,83	924 ^a	919	1,05	10,30	5,32
α -Pineno	7,05	933 ^a	925	1,05	2,02	1,04
Sabineno	8,39	969 ^a	964	1,05	4,11	2,12
β -Pineno	8,50	974 ^a	967	1,05	1,21	0,62
Mirceno	9,00	988 ^a	982	1,05	1,32	0,68
α -Felandreno	9,51	1002 ^a	997	1,05	64,67	33,41
α -Terpineno	9,99	1014 ^a	1009	1,05	1,08	0,56
p-Cimeno	10,29	1020 ^a	1016	1,05	4,83	2,49
β -Felandreno	10,48	1025 ^a	1021	1,05	11,84	6,12
γ -Terpineno	11,70	1054 ^a	1050	1,05	5,60	2,89
Isoterpinoleno	12,94	1085 ^a	1080	1,05	48,55	25,08
<i>Monoterpeno Oxigenado</i>						
Terpinen-4-ol	16,84	1174 ^a	1169	1,53	0,43	0,22
<i>Sesquiterpeno não oxigenado</i>						
α -Cubebeno	24,42	1348 ^a	1342	2,27	0,18	0,09
α -Ilangeno	25,54	1373 ^a	1368	2,27	1,99	1,03
(E)-Cariofileno	27,36	1419 ^a	1411	2,27	15,25	7,88
α -Humuleno	28,77	1452 ^a	1445	2,27	2,06	1,06
Germacreno D	29,89	1480 ^a	1473	2,27	9,51	4,91
Biclogermacreno	30,54	1500 ^a	1489	2,27	0,91	0,47
δ -Cadineno	31,60	1522 ^a	1515	2,27	0,85	0,44
<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>						
Espatulol	33,70	1577 ^a	1569	0,49	1,47	0,76
Óxido de Cariofileno	33,90	1582 ^a	1574	0,49	1,32	0,68
NI	35,49	-	1615	0,49	0,91	0,47
Epóxido de Allo-aromadendreno	36,06	1639 ^a	1631	0,49	1,50	0,77
					Total (%):	99,16

NI = não identificado; TR = tempo de retenção; IA = índice aritmético; FRR = fator de resposta relativo; ^aAdams (2007);*Calculada baseada na injeção de 1 μL .

Figura 6 – Comparação dos constituintes majoritários (%) do óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum*.



Bandeira et al. (2001)¹; Pontes et al. (2007)²; Araújo et al. (2011)³; Citó et al. (2006)⁴; Zoghbi et al. (1995)⁵; De Carvalho (2013)⁶; Tafurt-García & Muñoz-Acevedo (2012)⁷; Dados do presente trabalho⁸.

A figura 6 mostra que os componentes majoritários do óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum* não apresentam um padrão comum quando se compara trabalhos já publicados.

A tabela 4 mostra a constituição química do óleo essencial de *H. brasiliense*, com destaque para presença majoritária de sesquiterpenos não oxigenados. Foram identificados 25 compostos e os majoritários foram carotol (15,74%), biciclogermacreno (15,49%), germacreno D (13,87%), (*E*)- α -bisaboleno (11,01%), β -eudesmol (9,23%) e espatulenol (6,98%).

Existem poucos trabalhos na literatura que descrevem a constituição química de óleos essenciais das folhas de *H. brasiliense*. A figura 7 mostra uma comparação do que já se tem descrito com os dados encontrados no presente trabalho. Outros autores também encontraram o carotol, espatulenol (KIRCHNER et al., 2010) e α -bisaboleno (MUNDINA et al., 2000) como majoritários.

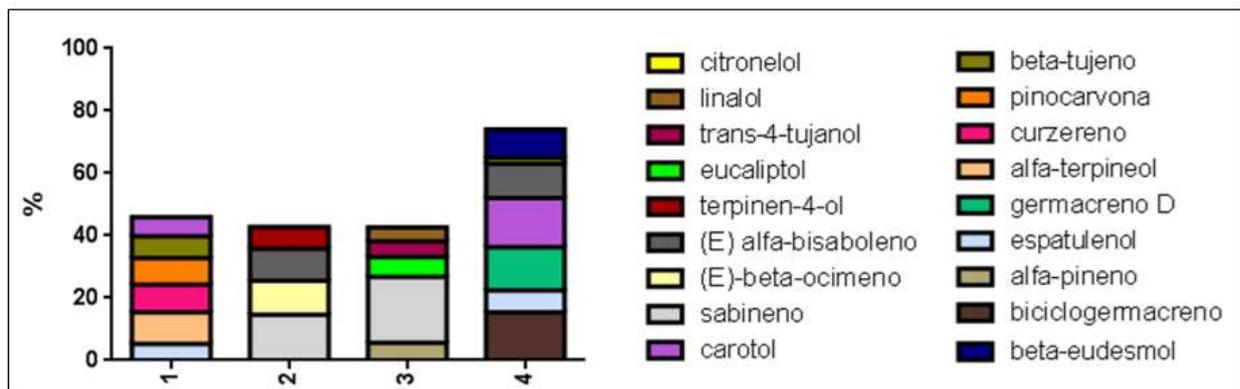
Tabela 4: Composição química do óleo essencial das folhas de *H. brasiliense*.

Composto	TR	IA Ref.	IA Calc.	FRR	Concentração* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%
<i>Monoterpeno não Oxigenado</i>						
Mirceno	9,09	988 ^a	984	1,05	2,02	1,41
α -Felandreno	9,59	1002 ^a	999	1,05	1,17	0,82
Silvestreno	10,53	1025 ^a	1022	1,05	0,39	0,27
<i>Monoterpeno Oxigenado</i>						
Citronelol	19,15	1223 ^a	1222	1,53	2,47	1,72
Neral	19,71	1235 ^a	1234	1,53	0,26	0,18
Geranial	21,04	1264 ^a	1264	1,53	0,29	0,20
Timol	21,96	1289 ^a	1285	1,53	0,33	0,23
<i>Sesquiterpeno não oxigenado</i>						
δ -Elemeno	23,90	1335 ^a	1330	2,27	0,35	0,24
NI	24,60	-	1346	2,27	0,83	0,58
NI	25,09	-	1358	2,27	0,83	0,58
α -Ilangeno	25,55	1373 ^a	1368	2,27	0,30	0,21
NI	25,94	-	1377	2,27	0,32	0,22
β -Elemeno	26,24	1389 ^a	1384	2,27	0,74	0,52
Cipereno	26,56	1398 ^a	1392	2,27	0,21	0,15
(<i>E</i>)-Cariofileno	27,38	1417 ^a	1411	2,27	0,78	0,54
α -Humuleno	28,78	1452 ^a	1446	2,27	0,54	0,38
NI	29,74	-	1469	2,27	0,35	0,24
Germacreno D	29,91	1480 ^a	1473	2,27	19,89	13,87
Biciclogermacreno	30,54	1500 ^a	1488	2,27	22,21	15,49
α -Muuroleno	30,69	1500 ^a	1492	2,27	0,68	0,47
NI	31,26	-	1506	0,49	2,42	1,69
δ -Cadineno	31,61	1524 ^b	1515	0,49	3,91	2,73
(<i>E</i>)- α -Bisaboleno	32,37	1545 ^b	1535	0,49	15,79	11,01

<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>						
Elemol	32,60	1548 ^a	1541	0,49	1,28	0,89
Espatulenol	33,69	1577 ^a	1569	0,49	10,00	6,98
Globulol	33,95	1582 ^b	1575	0,49	3,47	2,42
Viridiflorol	34,26	1592 ^a	1583	0,49	2,05	1,43
Carotol	34,44	1594 ^a	1588	0,49	22,57	15,74
γ -Eudesmol	35,76	1630 ^a	1623	0,49	1,54	1,07
β -Eudesmol	36,45	1649 ^a	1641	0,49	13,23	9,23
Total (%):						91,54

NI = não identificado; TR = tempo de retenção; IA = índice aritmético; FRR = fator de resposta relativo; ^aAdams (2007); ^bNIST; *Calculada baseada na injeção de 1 μ L.

Figura 7 – Comparação dos constituintes majoritários (%) do óleo essencial das folhas de *H. brasiliense*.



Kirchner et al. (2010)¹; Mundina et al. (2000)²; Martínez et al. (2007)³; Dados do presente trabalho⁴.

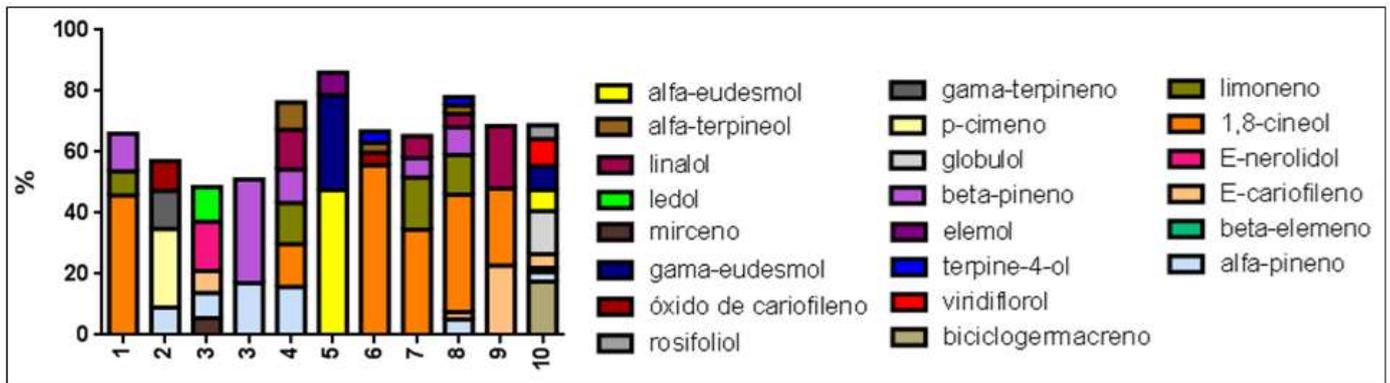
Em *B. salicifolius*, sesquiterpenos não oxigenados foram predominantes e 29 compostos foram identificados (tabela 5), sendo os majoritários o biciclogermacreno (17,50%), globulol (14,13%), viridiflorol (8,83%), γ -eudesmol (7,89%) e α -eudesmol (6,88%). Estes resultados são similares aos reportados na literatura com relação ao globulol (CASTELO, et al., 2012; COSTA et al., 2014), γ -eudesmol e α -eudesmol (GODINHO et al., 2014).

A figura 8 mostra uma comparação entre os componentes majoritários já descritos pra óleos essenciais de folhas desta espécie e observa-se que o limoneno, β -pineno, linalol e 1,8-cineol (TUCKER et al., 1993; DELLACASSA et al., 1997; MOREIRA et al., 1999; LIMBERGER et al., 2001; FURLÁN et al., 2002; GARNEAU et al., 2013) foram os compostos mais comuns. No entanto, nenhum destes foram encontrados como majoritário no presente trabalho.

Tabela 5: Composição química do óleo essencial das folhas de *B. salicifolius*.

Composto	TR	IA Ref.	IA Calc.	FRR	Concentração* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%
<i>Monoterpeno não Oxigenado</i>						
α -Pinoeno	7,05	932 ^a	925	1,05	3,66	3,22
β -Pinoeno	8,50	974 ^a	967	1,05	0,85	0,75
(E)- β -Ocimeno	11,23	1044 ^a	1039	1,05	0,30	0,26
<i>Monoterpeno Oxigenado</i>						
Linalol	13,42	1095 ^a	1092	1,53	0,16	0,14
<i>Sesquiterpeno não oxigenado</i>						
δ -Elemeno	23,86	1335 ^a	1329	2,27	0,23	0,20
α -Ilangeno	25,42	1373 ^a	1365	2,27	0,15	0,13
Isoledeno	25,64	1374 ^a	1370	2,27	0,09	0,08
β -Elemeno	26,22	1389 ^a	1384	2,27	1,52	1,34
α -Gurjuneno	26,96	1409 ^a	1401	2,27	0,47	0,41
(E)-Cariofileno	27,36	1417 ^a	1411	2,27	5,11	4,49
NI	27,71	-	1419	2,27	0,10	0,09
NI	27,98	-	1426	2,27	0,11	0,10
α -Guaieno	28,16	1437 ^a	1430	2,27	0,65	0,57
β -Barbateno	28,35	1440 ^a	1435	2,27	0,14	0,12
α -Humuleno	28,75	1452 ^a	1445	2,27	0,53	0,47
Allo-Aromadendreno	29,07	1458 ^a	1453	2,27	0,90	0,79
NI	29,67	-	1467	2,27	0,26	0,23
Germacreno D	29,89	1480 ^a	1473	2,27	0,67	0,59
4(14),11-Eudesmadieno	30,09	1487 ^a	1477	2,27	0,27	0,24
NI	30,19	-	1480	2,27	0,22	0,19
Biclogermacreno	30,52	1500 ^a	1488	2,27	19,90	17,50
Germacreno A	30,86	1508 ^a	1496	2,27	0,74	0,65
γ -Cadineno	31,23	1513 ^a	1506	2,27	0,10	0,09
δ -Cadineno	31,60	1522 ^a	1515	2,27	0,46	0,40
<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>						
Elemol	32,60	1548 ^a	1541	0,49	1,58	1,39
NI	32,70	-	1543	0,49	0,46	0,40
NI	32,98	-	1550	0,49	0,67	0,59
Palustrol	33,30	1567 ^a	1559	0,49	4,36	3,83
Globulol	33,94	1582 ^b	1575	0,49	16,07	14,13
Viridiflorol	34,24	1592 ^a	1583	0,49	10,04	8,83
Cubeban-11-ol	34,32	1595 ^a	1585	0,49	5,00	4,40
Rosifoliol	34,66	1600 ^a	1593	0,49	5,16	4,54
NI	35,43	-	1614	0,49	2,58	2,27
γ -Eudesmol	35,75	1630 ^a	1622	0,49	8,97	7,89
β -Eudesmol	36,43	1649 ^a	1641	0,49	3,47	3,05
α -Eudesmol	36,57	1652 ^a	1645	0,49	7,83	6,88
Total (%):						91,26

NI = não identificado; TR = tempo de retenção; IA = índice aritmético; FRR = fator de resposta relativo; ^a Adams (2007); ^b NIST; *Calculada baseada na injeção de 1 μL .

Figura 8 – Comparação dos constituintes majoritários (%) do óleo essencial das folhas de *B. salicifolius*.

Moreira et al. (1999)¹; Costa et al. (2014)²; Garneau et al. (2013)³; Furlán et al. (2002)⁴; Godinho et al. (2014)⁵; Dellacassa et al. (1997)⁶; Landrum et al. (1993)⁷; Hernández et al. (2018)⁸; Limberger et al. (2001)⁹; Dados do presente trabalho¹⁰; Referências repetidas dizem respeito a dados do mesmo estudo que comparam sazonalidade, modos de extração ou locais de coleta diferentes.

Na tabela 6 estão destacados os 28 compostos identificados em *B. dracunculifolia*, sendo sesquiterpenos não oxigenados os terpenos mais encontrados no óleo essencial das folhas desta espécie. Os componentes majoritários foram o E-nerolidol (52%), espatulenol (8,53%), biciclogemacreno (5,82%), germacreno D (4,17%) e globulol (4,15%). Como mostra a figura 9, germacreno D, espatulenol e isômeros de nerolidol, são compostos tipicamente comuns no óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia*, sendo reportado pela maioria dos autores que caracterizaram os voláteis desta espécie (LOAYZA et al., 1995; MISSIMA et al., 2007; VILLÉN; BEAUSOLEIL; GYGI, 2008; MASSIGNANI et al., 2009; PARREIRA et al., 2010; GALVÃO et al., 2012; SILVA et al., 2012; DE ASSIS LAGE et al., 2015). Biciclogemacreno também já foi descrito por outros autores (MASSIGNANI et al., 2009; DE ASSIS LAGE et al., 2015), no entanto, com menos frequência o globulol está sendo relatado neste trabalho pela primeira vez como majoritário no óleo essencial das folhas desta espécie.

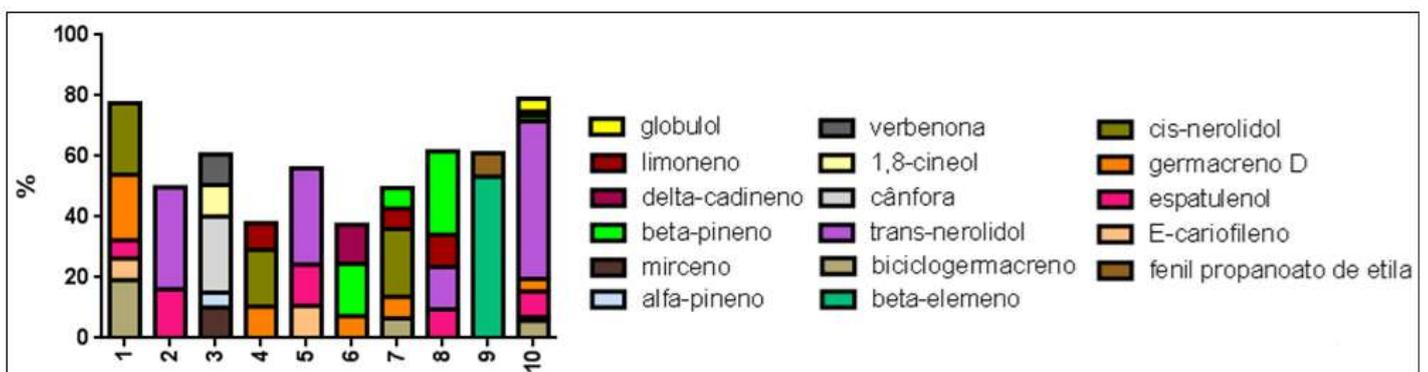
Tabela 6: Composição química do óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia*.

Composto	TR	IA Ref.	IA Calc.	FRR	Concentração* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%
<i>Monoterpeno não Oxigenado</i>						
α -Pineno	7,13	932 ^a	927	1,05	1,32	0,62
β -pineno	8,59	974 ^a	970	1,05	3,69	1,74
Mirceno	9,10	988 ^a	985	1,05	0,63	0,30
Limoneno	10,54	1024 ^a	1022	1,05	2,96	1,40
(E)- β -Ocimeno	11,35	1044 ^a	1042	1,05	0,50	0,24
<i>Monoterpeno Oxigenado</i>						

Linalol	13,52	1095 ^a	1094	1,53	0,35	0,16
<i>Sesquiterpeno não oxigenado</i>						
δ-Elemeno	23,88	1335 ^a	1329	2,27	0,14	0,07
α-Cubebeno	24,43	1348 ^a	1342	2,27	0,12	0,06
Copaeno	25,55	1376 ^a	1368	2,27	0,16	0,08
β-Elemeno	26,24	1389 ^a	1384	2,27	0,80	0,38
α-Gurjuneno	226,98	1409 ^a	1402	2,27	0,25	0,12
(E)-Cariofileno	27,38	1417 ^a	1411	2,27	2,16	1,02
Aromadendreno	28,18	1439 ^a	1431	2,27	0,95	0,45
α-Humuleno	28,77	1452 ^a	1445	2,27	1,24	0,59
NI	29,74	-	1469	2,27	0,87	0,41
Germacreno D	29,90	1480 ^a	1473	2,27	8,81	4,17
Biclogermacreno	30,54	1500 ^a	1488	2,27	12,31	5,82
α-Muuroloeno	30,69	1500 ^a	1492	2,27	0,92	0,43
NI	30,94	-	1498	2,27	0,42	0,20
γ-Cadineno	31,23	1513 ^a	1506	2,27	0,92	0,43
δ-Cadineno	31,61	1522 ^a	1515	2,27	3,43	1,62
<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>						
(E)-Nerolidol	33,17	1564 ^b	1555	0,49	109,95	52,00
Espatuleno	33,69	1577 ^a	1569	0,49	18,03	8,53
Globulol	33,94	1582 ^b	1575	0,49	8,77	4,15
Viridiflorol	34,24	1592 ^a	1583	0,49	2,80	1,32
Ledol	34,69	1602 ^a	1594	0,49	3,79	1,79
epi-α-Muurolol	36,13	1640 ^a	1633	0,49	4,52	2,14
α-Cadinol	36,62	1652 ^a	1646	0,49	5,64	2,67
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	37,77	1685 ^a	1677	0,49	1,67	0,79
Shiobunol	37,94	1688 ^a	1681	0,49	1,11	0,52
Total (%):						94,23

NI = não identificado; TR = tempo de retenção; IA = índice aritmético; FRR = fator de resposta relativo; ^aAdams (2007); ^bNIST; *Calculada baseada na injeção de 1 µL.

Figura 9 – Comparação dos constituintes majoritários (%) do óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia*.



Massignani et al. (2009)¹; Parreira et al. (2010)²; Boix et al. (2010)³; Silva et al. (2012)⁴; Galvão et al. (2012)⁵; Loayza et al. (1995)⁶; Lage et al. (2014)⁷; Fabiane et al. (2007)⁸; Lago et al. (2008)⁹; Dados do presente trabalho¹⁰.

Em *N. megapotamica*, 20 compostos foram identificados, com destaque principalmente para sesquiterpenos não oxigenados (tabela 7). Bicyclogermacreno (24,18%), α -pineno (17,32), β -pineno (16,24%), limoneno (6,58%), (*E*)-cariofileno (5,47%) e germacreno D (4,85%) foram os compostos majoritários no óleo essencial das folhas desta espécie. Todos estes terpenos são característicos das folhas de *N. megapotamica* quando se compara a outros trabalhos que descrevem a constituição química deste óleo essencial (figura 10). Amaral et al. (2015), Ferraz (2015), Reis e Apel (2013), Tondolo et al. (2013) e Torres et al. (2014) descreveram um perfil químico semelhante para este óleo e os majoritários identificados no presente trabalho também estão de acordo com o encontrado por estes autores (figura 10).

O óleo essencial de *N. megapotamica*, em comparação aos demais óleos investigados neste trabalho, foi o que apresentou um perfil de constituição química mais constante qualitativamente, quando feita a comparação com os achados de outros pesquisadores (Figura 10). Quando este fenômeno é observado, estes compostos frequentemente presentes podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos de uma espécie ou até mesmo de uma família botânica, sendo uma ferramenta importante utilizada como critério de identificação. Portanto, sugere-se investigações mais detalhadas sobre a viabilidade da aplicação destes terpenos (bicyclogermacreno, α -pineno, germacreno D e β -pineno) como marcadores químicos em *N. megapotamica* considerando-se ainda que, além da frequência, estes compostos também estão presentes em altas concentrações nesta espécie.

Tabela 7: Composição química do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*.

Composto	TR	IA Ref.	IA Calc.	FRR	Concentração* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%
<i>Monoterpeno não Oxigenado</i>						
α -Pineno	7,13	932 ^a	927	1,05	10,58	17,32
Sabineno	8,47	969 ^a	966	1,05	0,51	0,83
β -Pineno	8,59	974 ^a	970	1,05	9,92	16,24
Mirceno	9,09	988 ^a	984	1,05	0,72	1,18
Limoneno	10,54	1024 ^a	1022	1,05	4,02	6,58
<i>Sesquiterpeno não oxigenado</i>						
δ -Elemeno	23,91	1335 ^a	1330	2,27	0,24	0,39
α -Copaeno	25,55	1374 ^a	1368	2,27	0,66	1,08
β -Bourboneno	25,94	1387 ^a	1377	2,27	0,12	0,20
β -Elemeno	26,26	1389 ^a	1385	2,27	0,27	0,44
(<i>E</i>)-Cariofileno	27,38	1417 ^a	1411	2,27	3,34	5,47
α -Guaieno	28,18	1437 ^a	1431	2,27	0,16	0,26
α -Humuleno	28,78	1452 ^a	1446	2,27	0,72	1,18

allo-Aromadendreno	29,09	1458 ^a	1453	2,27	0,39	0,64
Germacreno D	29,91	1480 ^a	1473	2,27	2,96	4,85
Biclogermacreno	30,54	1500 ^a	1488	2,27	14,77	24,18
α -Muuroleno	30,71	1500 ^a	1493	2,27	0,14	0,23
NI	30,88	-	1497	2,27	0,19	0,31
δ -Cadineno	31,61	1522 ^a	1515	2,27	0,84	1,37
<i>Sesquiterpeno Oxigenado</i>						
Espatulenol	33,70	1577 ^a	1569	0,49	2,29	3,75
Globulol	33,94	1582 ^b	1575	0,49	1,46	2,39
Viridiflorol	34,24	1592 ^a	1583	0,49	0,84	1,37
Total (%):						90,29

NI = não identificado; TR = tempo de retenção; IA = índice aritmético; FRR = fator de resposta relativo; ^aAdams (2007); ^bNIST; *Calculada baseada na injeção de 1 μ L.

5.2 Atividades biológicas

5.2.1 Atividade citotóxica

O efeito citotóxico do óleo essencial foi avaliado em células Ehrlich, carcinoma de mama de camundongo e em células de câncer de mama humano estrógeno positivas (MCF-7) e estrógeno negativas (MDA-MB-231). Adicionalmente, uma linhagem de célula de mama normal humana, MCF-10A, foi avaliada. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade são mostrados na Tabela 8.

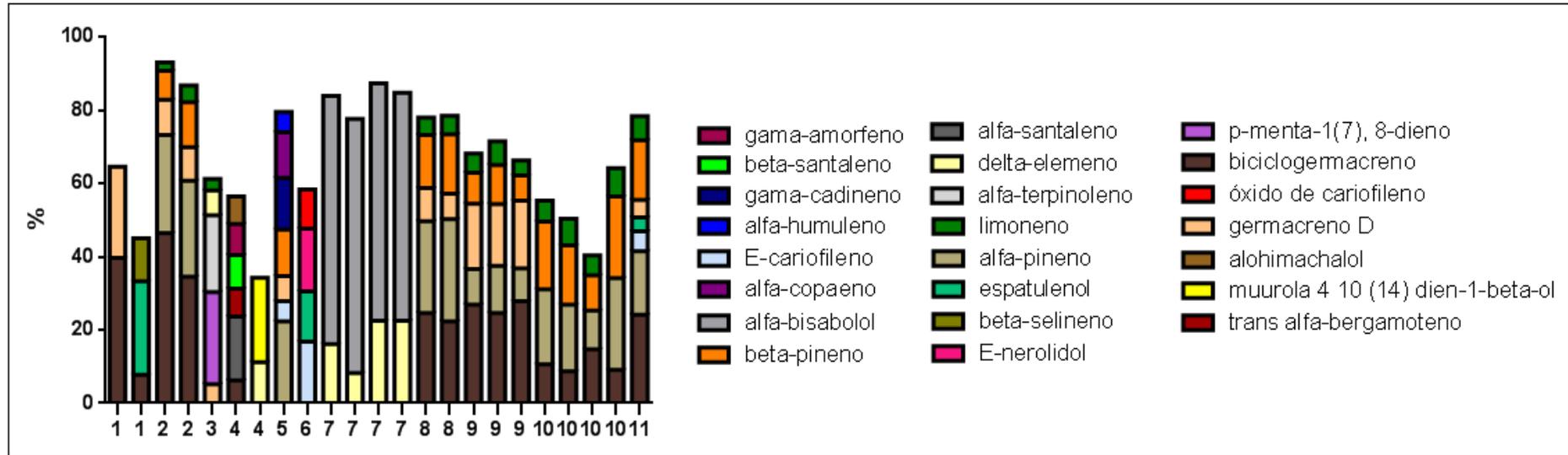
Tabela 8: Valores de CC₅₀ (μ g mL⁻¹) dos óleos essenciais contra uma linhagem de célula normal e linhagens de câncer de mama

Linhagem	PH	IS	HB	IS	BS	IS	BD	IS	NM	IS
Ehrlich	295,67 \pm 32,89 ^a	>0,23	51,59 \pm 9,65 ^b	>0,99	42,04 \pm 10,39 ^b	0,87	69,67 \pm 21,08 ^b	>0,88	51,43 \pm 25,73 ^b	>0,99
MCF-7	>512	-	>512	-	>512	-0,21	>512	-	>512	-
MDA-MB-231	>512	-	62,40 \pm 22,16 ^a	>0,89	46,60 \pm 8,22 ^a	0,83	>512	-	>512	-
MCF-10A	>512	-	>512	-	314,44 \pm 60,12	-	>512	-	>512	-

Seis replicatas; Valores são média \pm desvio padrão. **Ehrlich:** carcinoma ascítico de camundongos; **MCF-7** adenocarcinoma metastático humano; **MDA-MB-231:** adenocarcinoma metastático humano; **MCF-10A:** células epiteliais mamárias humanas; **IS:** índice de seletividade. **PH:** *P. heptaphyllum*; **HB:** *H. brasiliense*; **BS:** *B. salicifolius*; **BD:** *B. dracunculifolia*; **NM:** *N. megapotamica*. Diferentes letras na mesma linha representam diferenças significativas de CC₅₀ entre os óleos essenciais frente à mesma linhagem celular quando $p \leq 0,05$.

Contra as células Ehrlich, os óleos essenciais de *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, *B. dracunculifolia* e *N. megapotamica* apresentaram efeitos citotóxicos equivalentes estatisticamente, com CC₅₀ significativamente inferiores à apresentada pelo óleo essencial de *P. heptaphyllum*.

Figura 10 – Comparação dos constituintes majoritários (%) do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*.



Reis & Apel (2013)¹; Tondolo et al. (2013)²; Torres et al. (2005)³; Brito (2009)⁴; Wu et al. (2006)⁵; Marin et al. (2009)⁶; Romoff et al. (2010)⁷; Amaral et al. (2015)⁸; Torres et al. (2014)⁹; Ferraz (2015)¹⁰; Dados do presente trabalho¹¹. Referências repetidas dizem respeito a dados do mesmo estudo que comparam sazonalidade, modos de extração ou locais de coleta diferentes.

Células MDA-MB-231, que apresentam um fenótipo agressivo, foram sensíveis à ação tóxica dos óleos de *H. brasiliense* e *B. salicifolius*, com CC_{50} estatisticamente iguais. No entanto, células MCF-7, que apresentam um fenótipo menos agressivo, foram resistentes à ação de todos os óleos essenciais testados.

O tumor de Ehrlich se assemelha a tumores humanos que são mais sensíveis à quimioterapia, por serem indiferenciados e por apresentarem uma taxa de crescimento rápido (OZASLAN et al., 2011). São, portanto semelhantes aos tumores MDA-MB-231 aqui testados, e o fato dos óleos essenciais terem atuado nestas duas linhagens, mas não em MCF-7, reforça a ideia de que a ação destes terpenos se dá frente a tumores agressivos.

Várias dificuldades são associadas ao tratamento de tumores estrógeno-negativos, pois usualmente têm um prognóstico ruim e hormônio-terapias não são efetivas (NAKAGAWA-GOTO et al., 2016). Baseado nos resultados aqui encontrados para a linhagem MDA-MB-231, os óleos essenciais de *H. brasiliense* e *B. salicifolius* são candidatos promissores a investigações mais aprofundadas, pois de acordo com as diretrizes para prospecção de drogas anticâncer do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, valores de CC_{50} de até $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para produtos naturais são considerados ativos e interessantes para testes em estudos bioguiados (BOYD, 1997). Além disso, estes óleos essenciais apresentaram resultados similares a outros considerados ativos e com relevante ação contra este tipo celular, como *Decatropis bicolor*, com CC_{50} de $53,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ (GÓMEZ et al., 2016) e *Hedychium spicatum* com valores por volta de $65 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MISHRA et al., 2016).

Com relação à linhagem de células normais de mama MCF-10A, o óleo de *H. brasiliense* não foi citotóxico e estas células foram cerca de sete vezes mais resistentes à ação do óleo de *B. salicifolius* comparado a células cancerígenas Ehrlich e MDA-MB-231. Foi estabelecida uma relação entre a ação dos óleos essenciais contra células normais e contra as células de linhagem cancerígena através do índice de seletividade (IS) com o intuito de se determinar a especificidade de ação destes óleos (Tabela 8). Um valor positivo de IS é desejável e representa maior seletividade contra células cancerígenas que toxicidade para células normais. O valor negativo de IS do óleo de *B. salicifolius* contra MCF-7 (-0,21) indicou seletividade por células normais, mas os demais valores de IS positivos encontrados denotam seletividade por células cancerígenas. Como tumores MDA-MB-231 são limitados a tratamentos quimioterápicos e estes induzem efeitos tóxicos também em células normais, os resultados encontrados neste estudo reafirmam o potencial destes óleos essenciais como agentes citotóxicos por serem além

de ativos, também seletivos, podendo ser uma alternativa ao uso destes tratamentos convencionais agressivos.

As espécies *H. brasiliense* e *B. salicifolius*, que apresentaram melhor efeito citotóxico, foram pouco investigadas com relação a esta propriedade biológica. Neste sentido, com relação a *H. brasiliense*, somente sua ação contra células Vero (células epiteliais de rim de macaco) foi testada e este óleo se mostrou tóxico, com CC_{50} entre 28,1 e 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CORREA-ROYERO *et al.*, 2010).

Em *B. salicifolius*, o extrato metanólico, chalconas e ácido ursólico isolados de suas folhas apresentaram atividade citotóxica contra células MCF-7 (CALDERÓN *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2011), que foram aqui também testadas, mas não sensíveis à ação dos óleos avaliados. Isto sugere que o conteúdo e concentração, especialmente de compostos polares nesta espécie possam estar relacionados à ação citotóxica contra este tipo celular. Este extrato e compostos isolados foram avaliados contra outras linhagens como H-460 (câncer de pulmão), SF-268 (câncer do sistema nervoso central), UACC-62 (melanoma humano) e TK-10 (câncer renal) (CALDERÓN *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2011), no entanto, ainda não foi descrita na literatura uma avaliação da atividade citotóxica do óleo essencial de *B. salicifolius*, sendo este trabalho o primeiro a verificar esta ação.

Pela Tabela 9, observa-se os coeficientes de correlação dos componentes dos óleos essenciais estudados que mais contribuíram para a ação citotóxica frente às linhagens avaliadas. No apêndice B pode ser consultada a tabela completa.

Tabela 9: Coeficientes de correlação mais significativos entre atividades citotóxicas e concentração dos componentes majoritários dos óleos essenciais avaliados.

	bicloger.	viridiflorol	globulol	γ -eudesmol	α -eudesmol	rosifoliol	cubeban-11-ol	palustrol	α -pineno
Ehrlich	-0,700	-0,872	-	-0,707	-707	-0,707	-0,707	-0,707	-0,783
MDA-MB-231	-0,783	-0,918	-	-0,791	-791	-0,791	-0,791	-0,791	-
MCF-10A	-	-0,725	-0,707	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-

Contra Ehrlich e MDA-MB-231, o biciclogermacreno mostrou correlação forte. Capello *et al.* (2015) e Grecco *et al.* (2015) verificaram a ação do biciclogermacreno contra várias linhagens de células cancerígenas, inclusive contra MCF-7 e mostraram a ação citotóxica deste sesquiterpeno, com valores de CC_{50} entre 2,4 e 19 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, ainda que o biciclogermacreno seja o componente majoritário de um óleo essencial, este pode não

apresentar relevante citotoxicidade contra células MCF-7 como mostrado por Grecco et al. (2015) e observado pelos óleos essenciais aqui testados, pois estes também não tiveram ação contra esta linhagem celular. As propriedades biológicas dos óleos essenciais são geralmente determinadas pelos componentes em alta concentração (BAKKALI et al., 2008), no entanto, a atividade também pode ser resultado de efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos entre os constituintes individuais (LANG; BUCHBAUER, 2011).

O viridiflorol mostrou também correlação muito forte, com atuação contra a linhagem MDA-MB-231 e forte com relação as linhagens Ehrlich e MCF-10A. Selim, Al-Footy e Ayyad (2014) testaram este componente isolado contra células cancerígenas e comprovaram sua citotoxicidade, com valores de CC_{50} entre 17,3 e 100,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estes mesmos autores avaliaram a ação do viridiflorol e palustrol contra células Vero normais, mas nenhum efeito tóxico foi observado. No presente trabalho, estes compostos mostraram correlação forte e muito forte respectivamente, com o efeito citotóxico contra células normais de mama MCF-10A, sendo portanto necessários testes com estes compostos isolados frente a esta linhagem celular e outras linhagens normais para se comprovar esta ação.

Além do viridiflorol e palustrol, o γ -eudesmol, α -eudesmol, rosifoliol e cubeban-11-ol mostraram correlação com a ação citotóxica contra Ehrlich, MDA-MB-231 e MCF-10A, e o globulol, somente com relação a MCF-10A, no entanto, não há trabalhos na literatura destacando suas ações de forma isolada contra células de câncer e normais.

Com relação ao α -pineno, houve correlação com a toxicidade frente a linhagem de células Ehrlich, no entanto, Sobral et al. (2014) observaram que não houve ação antitumoral deste composto frente a esta linhagem celular, quando foram feitos testes *in vivo*.

5.2.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular por citometria de fluxo

Devido a promissora ação citotóxica dos óleos essenciais de *H. brasiliense* e *B. salicifolius* frente a células agressivas de tumor de mama, o estudo se aprofundou na busca pelo entendimento dos mecanismos de ação, e para iniciar tal investigação, foram feitas análises de citometria de fluxo, sendo os resultados expressos na figura 11.

Os diagramas de barras expressos na figura 11 mostram que frente a células de câncer de mama estrógeno negativas MDA-MB-231 o tratamento com o óleo essencial de *B. salicifolius* não mostrou diferenças estatísticas com relação ao controle quando analisada a

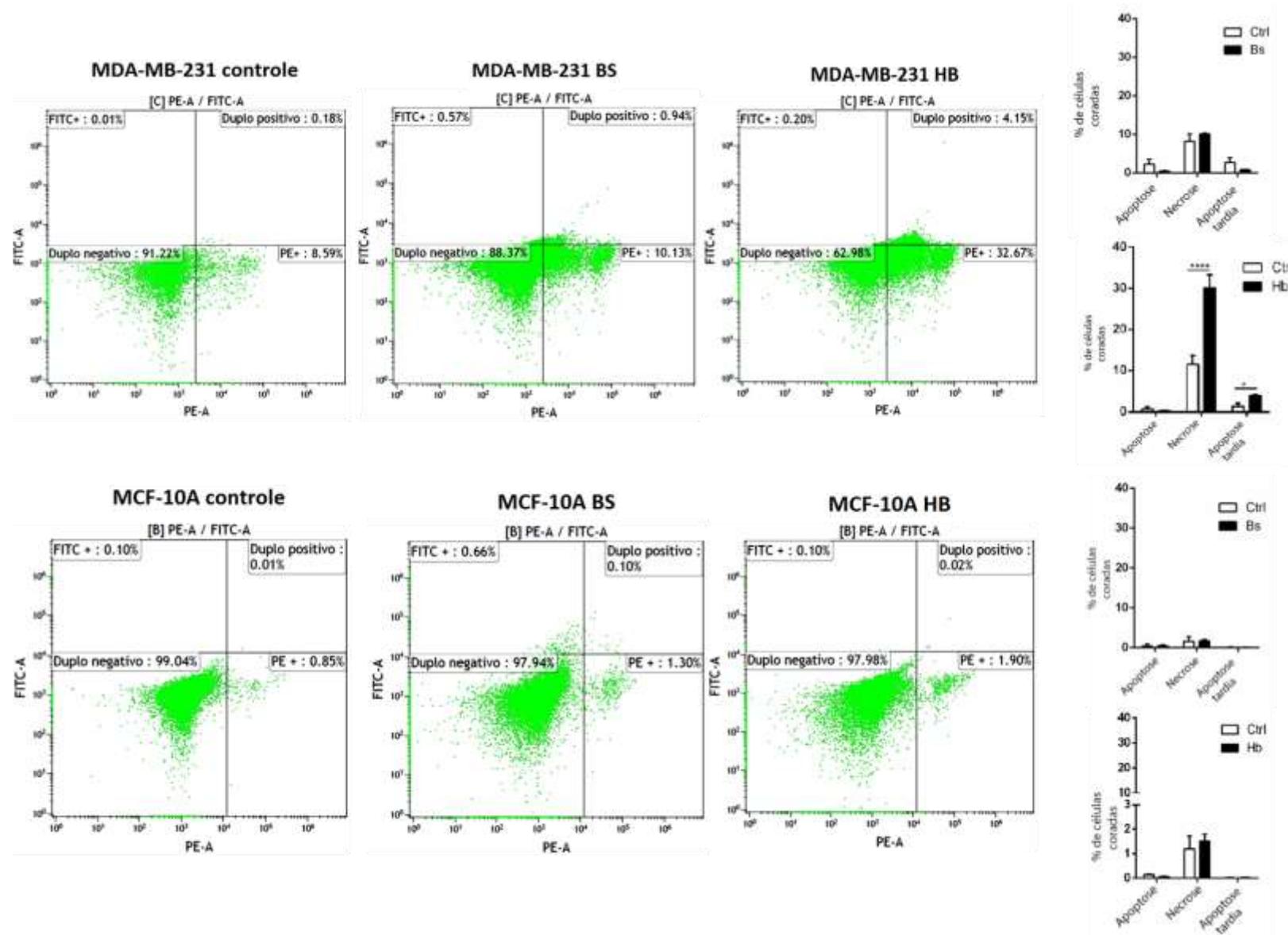
apoptose e necrose. Bols et al. (2005) consideram que a resazurina pode ser usada como substrato na verificação do comprometimento do metabolismo celular. Os resultados de citometria de fluxo cruzados com as análises de citotoxicidade mostram que a toxicidade do óleo de *B. salicifolius* não está envolvida com ativação de mecanismos de morte celular mas sim com a redução da capacidade metabólica celular, visto que uma redução da resazurina foi observada na presença deste óleo como já descrito.

Em contrapartida, quando estas mesmas células foram tratadas com o óleo de *H. brasiliense*, diferenças estatísticas foram encontradas, principalmente com relação à indução da morte celular por meio de necrose (figura 11). A apoptose tem sido considerada o principal mecanismo de morte celular induzido por drogas quimioterápicas e vias que regulam a apoptose são o foco de muitas investigações na busca por novas drogas anti-câncer (RICCI; ZONG, 2006). No entanto, a ativação de outras vias como a necrose também vêm sendo consideradas, com algumas drogas ou moléculas como a β -lapachona, apoptolidina e honokiol de atuação já comprovada por meio dessa via em células de câncer (RICCI; ZONG, 2006).

Com relação a linhagem de células normal de mama, MCF-10A, não foram observados aumento significativo de necrose e apoptose em decorrência do tratamento com os óleos essenciais quando estas células foram comparadas ao controle (figura 11). Como o óleo essencial de *H. brasiliense* mostrou ação significativa no processo de morte celular da linhagem MDA-MB-231, isso significa que este óleo tem uma ação específica para células tumorais, não afetando as células normais de mama.

Com o intuito de comprovar os resultados obtidos de ativação da necrose como principal via de morte em células MDA-MB-231, mais experimentos precisam ser realizados, com a investigação de marcadores moleculares que caracterizam este processo de morte celular.

Figura 11 – Análises de citometria de fluxo para as células MDA-MB-231 e MCF-10A sob a ação dos óleos essenciais de *B. salicifolius* e *H. brasiliense*.



Dados são expressos como média \pm desvio padrão para experimentos realizados em triplicata. **MDA-MB-231**: adenocarcinoma metastático humano; **MCF-10A**: células epiteliais mamárias humanas; **BS**: *B. salicifolius*; **HB**: *H. brasiliense*. Comparações entre as barras foram feitas pelo teste Two-Way ANOVA seguido por teste Sidak, usando o software GraphPad Prism 6.01. *representa diferenças significativas quando $p \leq 0,05$; **** representa diferenças significativas quando $p \leq 0,001$.

5.2.3 Atividade antileishmania

Pela Tabela 10, pode-se observar a ação dos óleos essenciais das folhas das espécies em estudo contra o parasita *Leishmania amazonensis* e macrófagos, suas principais células hospedeiras.

Tabela 10: Valores de CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos óleos essenciais contra *Leishmania amazonensis* e macrófagos imortalizados.

	<i>Leishmania amazonensis</i>	Macrófagos
<i>P. heptaphyllum</i>	>512	81,40 ± 7,26 ^a
<i>H. brasiliense</i>	175,83 ± 4,04 ^a	15,37 ± 2,51 ^b
<i>B. salicifolius</i>	107,17 ± 8,58 ^b	37,28 ± 7,18 ^c
<i>B. dracunculifolia</i>	100,54 ± 12,40 ^b	21,76 ± 11,53 ^b
<i>N. megapotamica</i>	405,41 ± 9,24 ^c	24,07 ± 5,67 ^b
<i>Anfotericina B</i>	0,29 ± 0,01 ^d	-

Seis replicatas; Valores são média ± desvio padrão. Anfotericina B: controle positivo. Diferentes letras representam diferenças significativas de CI_{50} ou CC_{50} entre os óleos essenciais frente ao parasita ou macrófagos quando $p \leq 0,05$.

A classificação da atividade antiprotozoária foi feita com base nos critérios de Calzada et al. (2009), onde CI_{50} menores que $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados como boa atividade, de 20 a $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, moderada, de 150 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, representam fraca atividade e valores acima de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados inativos. *P. heptaphyllum* e *N. megapotamica* foram portanto óleos essenciais inativos frente a *L. amazonensis*, *H. brasiliense* apresentou fraca atividade e tanto *B. salicifolius* quanto *B. dracunculifolia* foram moderadamente ativos.

Com relação à ação sobre parasitas, nenhum dos óleos das folhas destas espécies já havia sido testado, com exceção do óleo de *B. dracunculifolia*, que, segundo Parreira et al. (2010) apresentou atividade contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* e contra *Schistosoma mansoni*, porém foi inativo frente à *Plasmodium falciparum* e não citotóxico em relação a células Vero. Para o óleo com estas atividades, estes autores destacaram a presença majoritária de (E)-nerolidol (33,51%) e espatulenol (16,24%), compostos estes também majoritários no óleo essencial de *B. dracunculifolia* avaliado no presente trabalho,

representando 52% e 8,53% respectivamente da concentração total de compostos encontrados nesta espécie (tabela 6).

Alguns autores demonstraram a atividade do nerolidol como composto isolado sobre *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* (LOPES et al., 1999; GOULART et al., 2004; HOET et al., 2006; NIBRET; WINK, 2010) e inclusive contra *L. amazonensis* (ARRUDA et al., 2005). Rodrigues et al. (2004) sugeriram ainda um mecanismo de ação, propondo a atuação deste composto através da inibição da biossíntese de glicoproteínas ao competir com a biossíntese de derivados isoprenóides no metabolismo de *P. falciparum*. Com relação ao espatulenol, não há ainda estudos verificando sua ação antiprotozoária de forma isolada.

Neste trabalho, dentre os óleos essenciais avaliados, foi possível verificar que *B. salicifolius* apresentou a mesma ação de *B. dracunculifolia* contra *L. amazonensis*, sendo a constituição química destes óleos semelhante com relação à presença de biclogermacreno e globulol. Estes compostos são majoritários em *B. salicifolius* e mostraram correlação forte com a atividade encontrada como mostra a tabela 11. No apêndice B pode ser consultada a tabela completa.

Tabela 11: Coeficientes de correlação mais significativos entre atividade antileishmania e concentração dos componentes majoritários dos óleos essenciais avaliados.

	E-nerolidol	α -cadinol	epi- α -muurolol	ledol	globulol
<i>Leishmania amazonensis</i>	-0,728	-0,707	-0,707	-0,707	-0,900

Não há na literatura avaliação das ações do α -cadinol, epi- α -muurolol, ledol e globulol como agentes antiprotozoários. A partir dos resultados aqui obtidos, é possível sugerir uma verificação destes compostos de forma isolada, visto que estes possam estar relacionados também a melhor atividade obtida pelos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e *B. salicifolius*.

Ainda que *B. salicifolius* e *B. dracunculifolia* tenham mostrado certa ação contra este parasita, estes óleos foram tóxicos para macrófagos (tabela 10), uma de suas principais células hospedeiras, o que torna pouco interessante a investigação destes voláteis frente a formas amastigotas, responsáveis pelas manifestações clínicas.

5.2.4 Atividade antifúngica

A ação dos óleos essenciais contra diferentes cepas de fungos está expressa na tabela 12. Holetz et al. (2002) consideraram que valores de CIM inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ representam

boa atividade; de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, moderada atividade; de 500 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, fraca atividade; acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, inativo. Com base neste critério, a atividade antifúngica dos óleos essenciais testados não foi observada contra as espécies de cândida, *C. neoformans* e *M. canis*. Uma fraca atividade do óleo essencial de *B. salicifolius* sobre *T. mentagrophytes* foi encontrada, sendo os demais óleos inativos para este fungo. Quanto ao *P. brasiliensis*, os óleos de *H. brasiliense*, *B. salicifolius* e *N. megapotamica* mostraram atividade moderada, sendo os demais de ação fraca.

Tabela 12: Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os fungos testados

Cepas	PH	HB	BS	BD	NM	Anfotericina B
<i>Candida krusei</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	2,0
<i>Candida albicans</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	2,0
<i>Candida guilliermondii</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	2,0
<i>Candida parapsilosis</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	1,0
<i>Candida orthopsilosis</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	0,5
<i>Candida metapsilosis</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	0,25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2500 ^a	5000 ^b	2500 ^a	5000 ^b	>5000	0,5 ^c
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	625 ^a	234,37 ^b	156,25 ^b	625 ^a	468,75 ^a	0,37 ^c
<i>Microsporium canis</i>	1250 ^a	1250 ^a	2500 ^b	2500 ^b	5000 ^c	2,0 ^d
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2500 ^a	1250 ^b	625 ^c	5000 ^d	2500 ^a	1,0 ^e

Seis replicatas; Valores expressos em mediana. **PH:** *P. heptaphyllum*; **HB:** *H. brasiliense*; **BS:** *B. salicifolius*; **BD:** *B. dracunculifolia*; **NM:** *N. megapotamica*; **Anfotericina B:** controle positivo. Diferentes letras na mesma linha representam diferenças significativas de CIM entre os óleos essenciais frente à mesma cepa de fungo quando $p \leq 0,05$.

Até o momento, não há relatos na literatura sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *P. heptaphyllum*. Este trabalho mostra que, frente às cepas testadas, este óleo apresentou fraca atividade ou foi até mesmo inativo.

Segundo Kirchner et al. (2010), o óleo essencial de *H. brasiliense* foi ativo para *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, além disto, Vido (2009) também observou boa ação deste óleo contra *C. albicans*. No entanto, o óleo desta espécie não apresentou os mesmos resultados quando aqui avaliado, sendo inativo contra estas cepas, o que pode estar relacionado ao fato de que a constituição química, sobretudo dos compostos majoritários, é diferente entre estes óleos.

Já com relação ao óleo de *B. salicifolius*, não há descrito na literatura a atividade antifúngica contra nenhuma das cepas aqui testadas, sendo este trabalho o primeiro a fazer a verificação da ação deste óleo considerando estes microrganismos.

Pereira et al. (2011) mostraram ação do óleo essencial de *B. dracunculifolia* sobre 51 isolados de *Candida*, incluindo *C. albicans* e *C. parapsilosis* e ao contrário do observado no presente trabalho, mostraram que este óleo foi capaz de inibir o crescimento destas espécies.

O estudo de Brito (2009) está de acordo com os resultados aqui obtidos, pois mostrou não haver atividade antimicrobiana do óleo essencial de *N. megapotamica* sobre *C. albicans*. No entanto, Oliveira et al. (2017) mostraram que alguns dos sesquiterpenóides isolados desta espécie apresentam atividade contra este fungo e também sobre *C. neoformans*.

P. brasiliensis, o agente causador da paracoccidiodomicose, foi o fungo mais susceptível aos óleos essenciais testados. Poucos estudos relacionados à ação de óleos essenciais contra este fungo estão disponíveis, possivelmente por ser uma micose restrita a alguns países da América Latina. Em adição aos estudos previamente publicados, este trabalho oferece um indicativo de alguns terpenos que podem estar relacionados à inibição do crescimento de *P. brasiliensis* e são portanto alvos para futuras investigações com relação a sua ação quando considerados como compostos isolados.

Os coeficientes de correlação dos componentes dos óleos essenciais estudados que mais contribuíram para a ação antifúngica frente *P. brasiliensis* estão relacionados na Tabela 13. No apêndice B pode ser consultada a tabela completa.

Tabela 13: Coeficientes de correlação mais significativos entre atividades antifúngica e concentração dos componentes majoritários dos óleos essenciais avaliados.

	biciclogermacreno	viridiflorol	γ -eudesmol	α -eudesmol	rosifoliol	cubeban-11-ol	palustrol
<i>P. brasiliensis</i>	-0,872	-1,000	-0,725	-0,725	-0,725	-0,725	-0,725

O viridiflorol apresentou correlação muito forte e os demais compostos, correlação forte com a atividade antifúngica contra *P. brasiliensis*. Alguns autores afirmaram que o viridiflorol tem uma importante atividade antifúngica (ABAD; ANSUATEGUI; BERMEJO, 2006; PRIPDEEVECH; CHUKEATIROTE, 2010; HAMMAMI; KAMOUN; REBAI, 2011). Em contrapartida, Scher et al. (2004) atribuíram fraca atividade a este composto quando testado frente a *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae* e *Septoria tritici*.

Silva et al. (2007) mostraram que o biciclogermacreno tem ação antifúngica sobre *Cladosporium sphaerospermum*, no entanto, outras espécies de fungos precisam ser testadas para reafirmar o potencial antifúngico deste terpeno.

Com relação à eudesmol, estudos mostraram sua ação contra vários fungos (MORI; AOYAMA; DOI, 1997; GULERIA et al., 2012). Quanto aos demais compostos, rosifoliol, cubeban-11-ol e palustrol, não há na literatura até o momento avaliação sobre suas atividades antifúngicas. Embora a literatura não atribua ação antifúngica a alguns dos terpenos aqui destacados, é possível que estes compostos possam estar relacionados aos valores de CIM obtidos.

Os dois compostos de maior correlação com a atividade antifúngica, biciclogermacreno e viridiflorol, estão presentes como majoritários nos óleos essenciais de *H. brasiliense*, *B. salicifolius* e *N. megapotamica*, sendo estes os óleos essenciais que apresentaram melhor atividade contra *P. brasiliensis* (Tabela 12). A presença destes compostos parece ter sido determinante na atividade antifúngica, mas sua ação não pode ser atribuída somente a eles, devido à possibilidade de inúmeras interações entre os demais terpenos que podem ter contribuído para os resultados obtidos.

Alguns dos óleos essenciais aqui avaliados apresentaram valores de CIM menores do que os encontrados para outros óleos essenciais ou compostos isolados já testados contra *P. brasiliensis* (PASSOS et al., 2003; COSTA et al., 2010; JOHANN et al., 2012). Dada certa atividade destes óleos e sua volatilidade, seria plausível o emprego destes em terapia complementar por via inalatória, visto que, a infecção por este fungo é iniciada por inalação de conídios ou fragmentos miceliais que subsequentemente se diferenciam na forma leveduriforme no epitélio alveolar (SHANKAR et al., 2011), além desta micose envolver também os pulmões em fase crônica (RASTREPO; TOBÓN; CANO, 2015). Com este intuito, avaliações de toxicidade e eficácia devem ser conduzidas para comprovar a viabilidade deste tipo de tratamento, podendo ser uma alternativa auxiliar a drogas antifúngicas convencionais.

5.2.5 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi determinada para algumas bactérias de importância clínica como mostrado na tabela 14.

O óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum* ainda não havia sido avaliado com relação a sua atividade antibacteriana, sendo este trabalho o primeiro a testar esta atividade. Este óleo, no entanto, não foi ativo frente às bactérias aqui verificadas.

Segundo Kirchner et al. (2010) e Vido (2009), o óleo essencial de *H. brasiliense* possui atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, ação esta que contraria os resultados aqui obtidos, pois nenhuma atividade deste óleo foi observada frente a estes microrganismos.

O óleo essencial das folhas de *B. salicifolius* ainda não havia sido investigado contra nenhum organismo bacteriano. Este estudo mostrou que este óleo não apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias avaliadas.

Tabela 14: Concentração Inibitória Mínima e CIM 90% ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para as bactérias testadas

	Cepas	PH	HB	BS	BD	NM	Polimixina B	Cefalotina
Gram-positivas	MRSA	5000 ^a	2500 ^a	2500 ^a	2500 ^a	5000 ^a	-	2,0 ^b
	CIM 90%	5000	4416	4125	4416	5000		
	MSSA	5000 ^a	5000 ^a	1250 ^b	5000 ^a	2500 ^c	-	0,5 ^d
	CIM 90%	5000	4650	2062	4708	4125		
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	5000 ^a	1,0 ^b	-				
	CIM 90%	5000	5000	5000	5000	5000		
	<i>P. aeruginosa</i>	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	1,0	-

n=7, 1 ATCC e 6 isolados clínicos; Valores expressos em mediana. **MRSA:** *Staphylococcus aureus* metilicina resistente; **MSSA:** *Staphylococcus aureus* metilicina sensível. **PH:** *P. heptaphyllum*; **HB:** *H. brasiliense*; **BS:** *B. salicifolius*; **BD:** *B. dracunculifolia*; **NM:** *N. megapotamica*; **Polimixina B e Cefalotina:** controles positivos. Diferentes letras na mesma linha representam diferenças significativas de CIM entre os óleos essenciais frente à mesma cepa bacteriana quando $p \leq 0,05$.

Com relação ao óleo das folhas de *B. dracunculifolia*, ao contrário do que foi aqui observado, há comprovação da atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (FERRONATTO et al., 2007; SILVA et al., 2012). No entanto, as análises de Miranda et al. (2015) mostram concordância com os resultados aqui obtidos por não observar ação deste óleo contra *S. aureus* e *E. coli*.

O óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* já foi testado contra uma série de microrganismos e há trabalhos que comprovam sua ação e a ação dos seus compostos isolados sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (APEL et al., 2006; FERRAZ, 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

Em contrapartida, alguns estudos mostram a pouca ação ou inatividade deste óleo frente a estas bactérias (WERKA et al., 2007; BRITO, 2009), assim como aqui observado.

Resultados diferentes para atividades biológicas, quando comparadas às análises de vários pesquisadores com relação a mesmas espécies, são justificáveis devido ao fato da constituição química dos óleos essenciais não apresentarem um padrão qualitativo e quantitativo fixos.

Foi possível observar que os óleos essenciais tiveram maior dificuldade de atuação frente a bactérias Gram-negativas (tabela 14). Em geral, os óleos essenciais são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas, pois a membrana externa que faz parte da parede das bactérias Gram-negativas restringe a difusão de compostos hidrofóbicos pela camada lipopolissacarídica (VERGIS et al., 2013). Além disto, a espécie *P. aeruginosa* é geralmente menos susceptível a uma gama diversificada de compostos antimicrobianos incluindo os óleos essenciais (THORMAR, 2011). Esta susceptibilidade reduzida tem sido atribuída à membrana externa e a propriedades associadas, tais como efluxo de fármacos (GRIFFIN; WYLLIE; MARKHAM, 2001; LONGBOTTOM et al., 2004).

5.2.6 Sinergismo com drogas antibacterianas

Nas figuras 12, 13 e 14 estão representados os resultados das interações entre os óleos essenciais e drogas antimicrobianas frente aos microrganismos MRSA, MSSA e *E. coli* respectivamente.

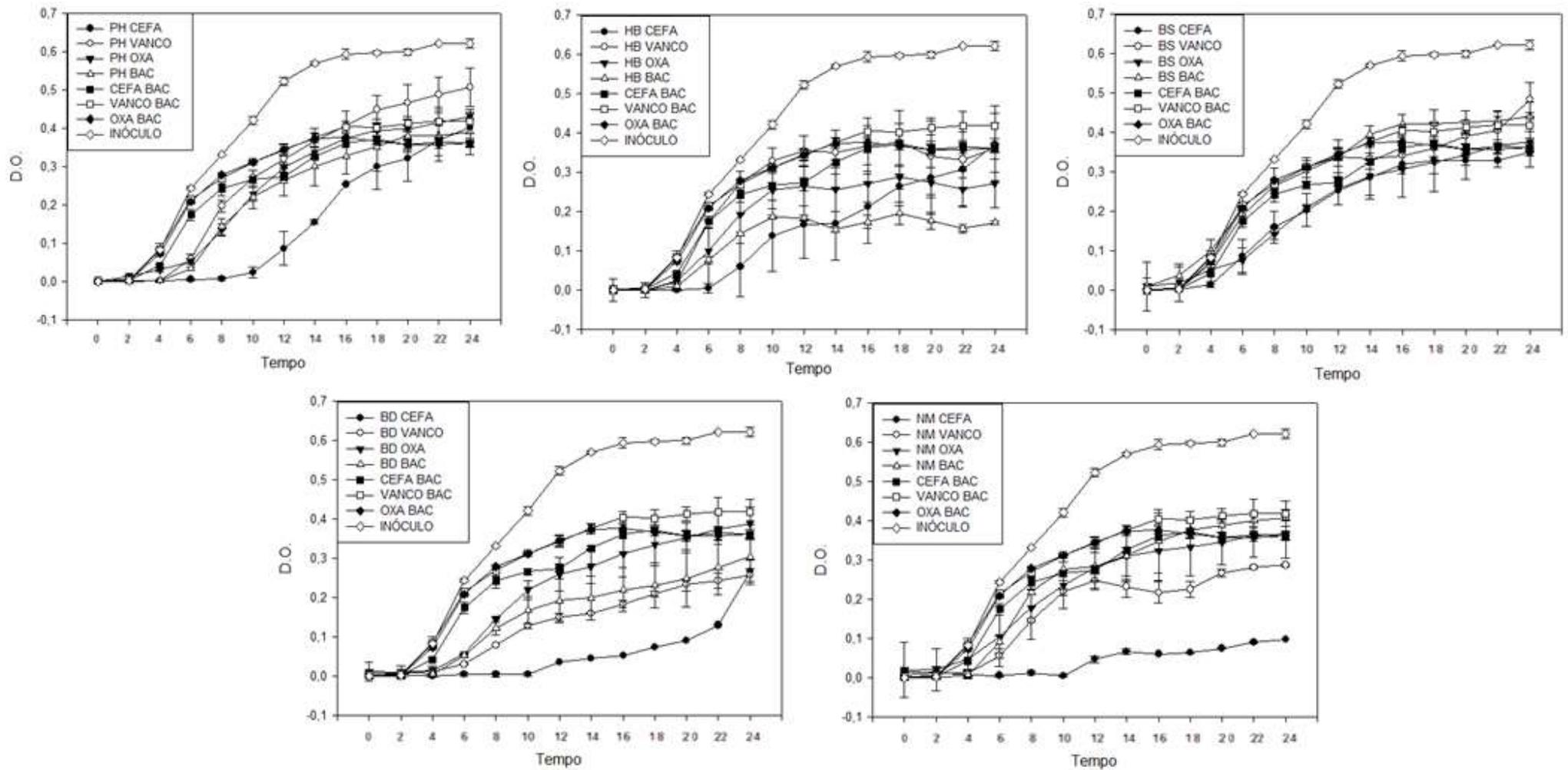
Para MRSA, nenhum dos óleos essenciais apresentou efeito sinérgico com as drogas testadas a ponto de levar a um efeito bactericida. Frente a este microrganismo, somente a interação de *N. megapotamica* com a cefalotina mostrou um ação sinérgica mais importante quando comparada a outras interações, mas sem efeito bactericida (figura 12).

Quando avaliado MSSA, o óleo essencial de *H. brasiliense* atuou em sinergismo com as drogas cefalotina e oxacilina (figura 13), mostrando que estas drogas podem chegar ao seu efeito bactericida, comprovado por plaqueamento, quando ensaiadas a um quarto de suas CIMs na presença deste óleo.

Quando avaliado *E. coli*, a droga gentamicina atuou de forma sinérgica com os óleos essenciais de *P. heptaphyllum*, *H. brasiliense*, *B. salicifolius*, e *N. megapotamica*, levando esta droga a ação bactericida a uma concentração abaixo de sua CIM.

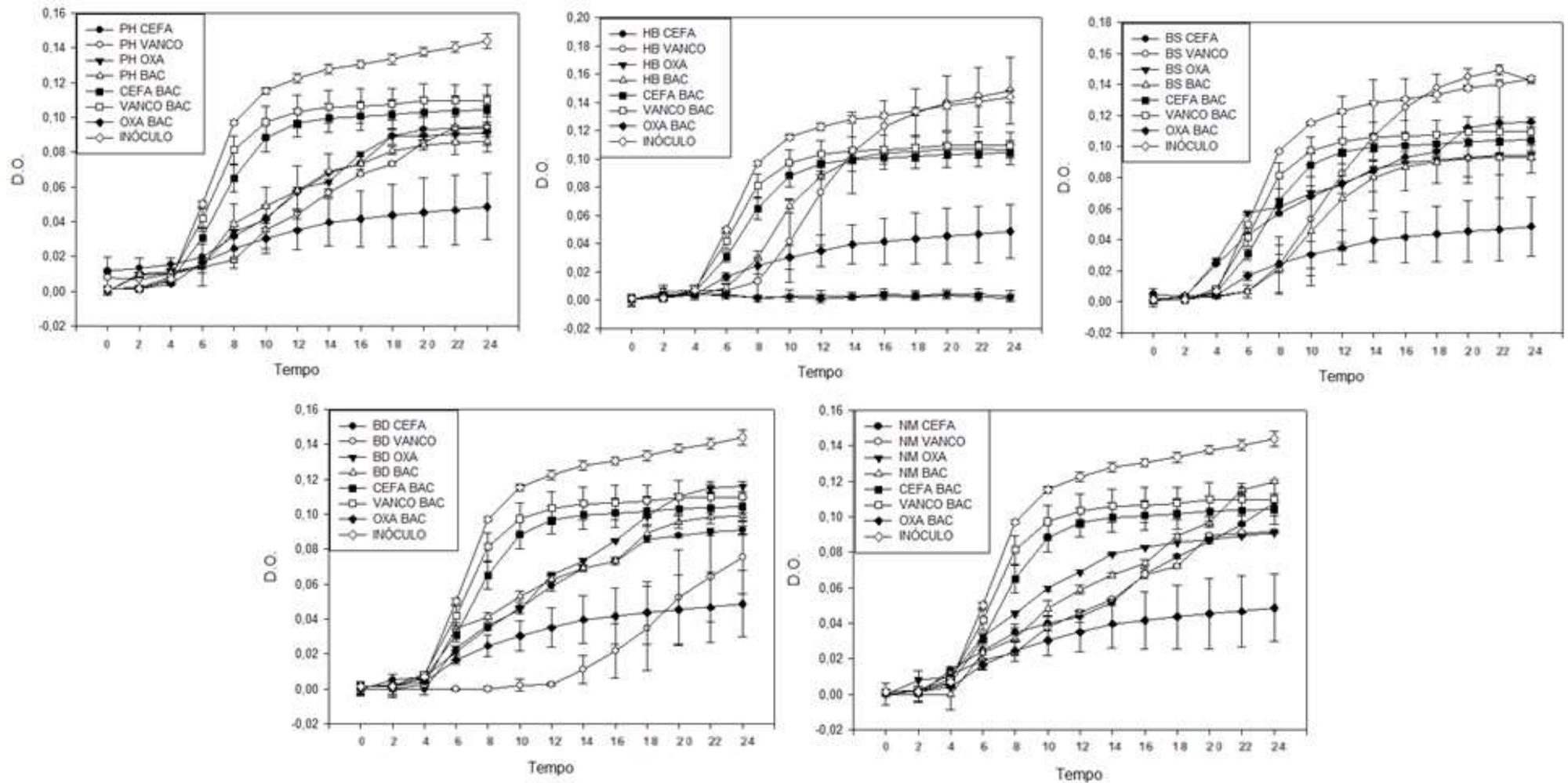
Estes resultados mostram que nestes óleos essenciais onde o sinergismo foi observado existem moléculas que podem estar potencializando o efeito destas drogas. Os metabólitos secundários de plantas são boas fontes de moléculas para terapia combinada com antibióticos, uma vez que podem atuar modificando a resistência dos patógenos às drogas, levando à diminuição da dose efetiva e por consequência reduzindo os efeitos colaterais por eles causados (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Figura 12 - Curva de sobrevivência descrita para MRSA na verificação do sinergismo entre os óleos essenciais e drogas antimicrobianas.



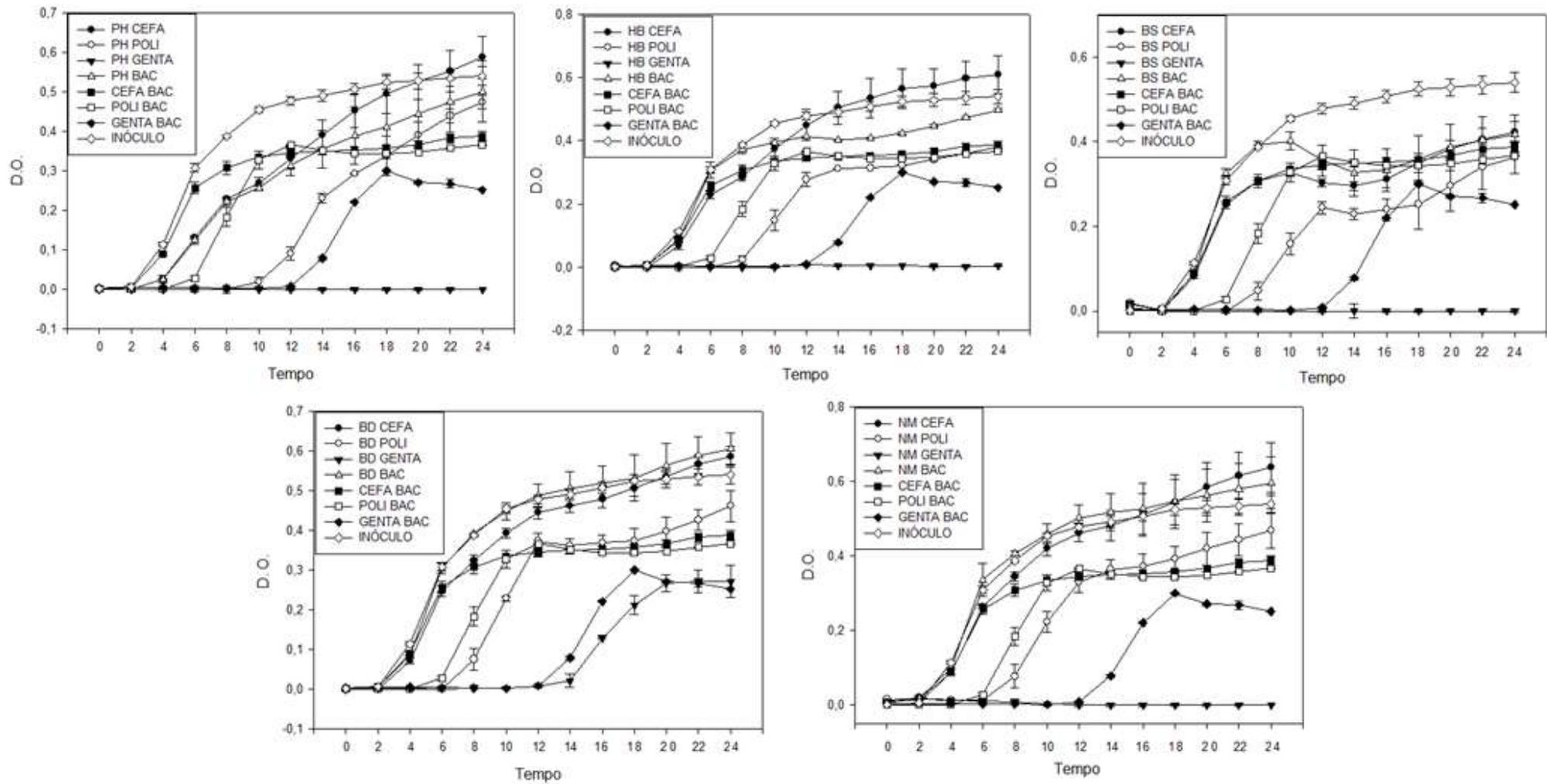
Dados são representados como média \pm desvio padrão para experimentos realizados em triplicata. **PH**: *P. heptaphyllum*; **HB**: *H. brasiliense*; **BS**: *B. salicifolius*; **BD**: *B. dracunculifolia*; **NM**: *N. megapotamica*; **CEFA**: cefalotina; **VANCO**: vancomicina; **OXA**: oxacilina.

Figura 13- Curva de sobrevivência descrita para MSSA na verificação do sinergismo entre os óleos essenciais e drogas antimicrobianas.



Dados são representados como média \pm desvio padrão para experimentos realizados em triplicata. **PH:** *P. heptaphyllum*; **HB:** *H. brasiliense*; **BS:** *B. salicifolius*; **BD:** *B. dracunculifolia*; **NM:** *N. megapotamica*; **CEFA:** cefalotina; **VANCO:** vancomicina; **OXA:** oxacilina.

Figura 14 - Curva de sobrevivência descrita para *E. coli* na verificação do sinergismo entre os óleos essenciais e drogas antimicrobianas.



Dados são representados como média \pm desvio padrão para experimentos realizados em triplicata. **PH:** *P. heptaphyllum*; **HB:** *H. brasiliense*; **BS:** *B. salicifolius*; **BD:** *B. dracunculifolia*; **NM:** *N. megapotamica*; **CEFA:** cefalotina; **POLI:** polimixina; **GENTA:** gentamicina.

6 Conclusões

Neste estudo foram verificadas as constituições químicas e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica*, sendo algumas destas ainda não descritas na literatura.

Os óleos essenciais de *H. brasiliense* e *B. salicifolius* se mostraram promissores agentes citotóxicos frente a células tumorais de mama triplo-negativas (MDA-MB-231) pela sua ação e seletividade aqui demonstradas. Portanto, estes óleos são fontes de moléculas que podem desempenhar um importante papel na descoberta de novas terapêuticas para o tratamento de tumores estrógeno-negativos, que são mais agressivos e não responsivos aos tratamentos hormonais. As análises de citometria de fluxo sugerem o mecanismo de morte celular das células avaliadas quando tratadas, no entanto, experimentos confirmatórios precisam ainda ser realizados a fim de assegurar como estes óleos levam ao efeito citotóxico. Além disso, ação antifúngica dos óleos essenciais destas espécies e de *N. megapotamica* sobre *Paracoccidioides brasiliensis* mostraram que estes voláteis têm potencial para serem incluídos como terapia complementar no tratamento desta micose.

A pouca viabilidade do emprego destes óleos contra *L. amazonensis* e a inatividade contra as bactérias testadas foram aqui demonstradas e estes óleos, em suas presentes constituições químicas, não tiveram ação relevante frente a estes microrganismos. Contudo, experimentos de sinergismo mostraram que alguns destes óleos quando associados a determinadas drogas antimicrobianas, podem levar estas a apresentarem seus efeitos bactericidas a $\frac{1}{4}$ da concentração de suas doses efetivas.

Os resultados obtidos sobretudo para óleos de *H. brasiliense* e *B. salicifolius* incentivam investigações mais aprofundadas de suas propriedades. Nesta tese foram sugeridos alguns compostos que podem estar relacionados aos efeitos biológicos encontrados e são sugestivos para exploração pela indústria farmacêutica na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

ABAD, Maria José; ANSUATEGUI, María; BERMEJO, Paulina. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*, v. 2007, n. vii, p. 116–145, 2006.

ADAMS, Robert P. *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4th. ed. [S.l.]: Allured Pub Corp, 2007. Disponível em: <https://www.amazon.com/Identification-Essential-Components-Chromatography-Spectrometry/dp/1932633219/ref=sr_1_1?ie=UTF8&qid=1474217689&sr=8-1&keywords=identification+of+essential+oil+components+by+gas+chromatography%2Fmass+spectrometry+4th+edition>.

ADORJAN, Barbara; BUCHBAUER, Gerhard. Biological properties of essential oils: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 25, n. 6, p. 407–426, 2010.

AIRES, Carolina P. *et al.* Baccharis dracunculifolia-based mouthrinse alters the exopolysaccharide structure in cariogenic biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 84, p. 301–307, 2016.

AKAO, Yukihiro *et al.* Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 26, n. 7, p. 1057–9, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843641>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

ALICE, C. B. *et al.* Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 35, n. 2, p. 165–171, 1991.

ALVES, Elma Oliveira *et al.* Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 32, n. 2, p. 651–658, 2008.

ALVES, Everton Giovanni *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500052&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 2 dez. 2016.

AMARAL, Lúcio De Paula; SIMONI, Juliana; *et al.* Seasonal Influence on the Essential Oil Production of *Nectandra megapotamica* (Spreng .) Mez. v. 58, n. February, p. 12–21, 2015.

AMARAL, Lúcio De Paula; SCHINDLER, Bianca; *et al.* Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng .) Mez (Lauraceae). v. 14, n. 3, p. 190–205, 2015.

AMOAH, Solomon K S *et al.* Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4??,10??-diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. *European Journal of Pharmacology*, v. 769, p. 195–202, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.018>>.

AMOAH, Solomon K S *et al.* Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry*, v. 87, p. 126–132, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.018>>.

AMOAH, Solomon K.S. *et al.* Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry Letters*, v. 13, p. 267–274, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439001530029X>>.

AMOAH, Solomon Kweku Sagoe. *Estudo químico de Hedyosmum brasiliense* Miq., *Chloranthaceae*. 2015. 142 f. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

ANDRADE, N. S.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, E. L. Lack of clastogenic/genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* extract on Swiss mouse peripheral blood cells. *Genetics and molecular research : GMR*, v. 7, n. 4, p. 1414–1421, 2008.

APEL, Miriam A. *et al.* Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic Rain Forest (São Paulo - Brazil). *Pharmacologyonline*, v. 3, p. 376, 2006.

ARAGÃO, Gislei Frota. *Atividade antiinflamatória, antiagregante plaquetária e efeitos centrais de Alfa e Beta Amirina isolada de Protium heptaphyllum Aubl March*. 2004. 187 f. Universidade Federal do Ceará, 2004.

ARAUJO, Deborah a O Valim *et al.* Gastroprotective effects of essential oil from *Protium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*,

v. 21, n. 4, p. 721–729, 2011.

ARRUDA, D. C. *et al.* Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 5, p. 1679–1687, 1 maio 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855481>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

BACHIEGA, T.F. *et al.* Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. *Natural Product Research*, v. 27, n. 18, p. 1646–1650, set. 2013. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2012.742078>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

BAJPAI, Vivek K.; SHUKLA, Shruti; SHARMA, Ajay. Essential Oils as Antimicrobial Agents. *Natural Products*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 3975–3988. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-22144-6_169>. Acesso em: 15 out. 2016.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BANDEIRA, P N *et al.* Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, n. 1, p. 33–34, 2001.

BANDEIRA, Paulo Nogueira *et al.* Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* march. *Química Nova*, v. 25, n. 6b, p. 1078–1080, 2002.

BANOV, DANIEL (SUGAR LAND, TX, US). *Topical Pharmaceutical Bases for Treating Skin Conditions*. . [S.l: s.n.]. , 2016

BARNECHE, Stephanie *et al.* Prospección química y microbiológica del bosque de galería del Río Uruguay. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 6, p. 878–885, 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000600009&lng=es&nrm=iso&tlng=en>.

BARROSO, Graziela Maciel. *COMPOSITAE — Subtribo BACCHARIDINAE Hoffmann: Estudo das espécies ocorrentes no Brasil*. Rio de Janeiro: [s.n.], 1976. Disponível em:

<https://www.jstor.org/stable/pdf/23492507.pdf?seq=1#page_scan_tab_contents>.

BOIX, Yilan Fung *et al.* Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 255–257, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25 nov. 2016.

BOLS, N.C. *et al.* Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, v. 6, p. 43–84, 1 jan. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873014005800050>>. Acesso em: 23 out. 2017.

BONETT, Lucimar Pereira *et al.* Extrato etanólico de representantes de cinco famílias de plantas e óleo essencial da família Asteraceae sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* coletados de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *REVISTA BRASILEIRA DE AGROECOLOGIA*, v. 7, n. 3, 2012.

BOYD, Michael R. The NCI In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Anticancer Drug Development Guide*. Totowa, NJ: Humana Press, 1997. p. 23–42. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-8152-9_2>. Acesso em: 16 dez. 2016.

BRITO, ANA FLAVIA RAMIRES. Análise de variação sazonal e das atividades antifúngica e antimicrobiana em óleos essenciais de *Ocotea porosa* (Nees) Barroso e *Nectandra megapotamica* (Spreng.). p. 123, 2009.

BÚFALO, M. C. *et al.* Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n. 5, p. 1669–1680, 2009.

BÚFALO, M.C. *et al.* *In vitro* cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Natural Product Research*, v. 24, n. 18, p. 1710–1718, 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786410902909300>>.

CALDERÓN, Ángela I. *et al.* Screening of Latin American Plants for Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Biology*, v. 44, n. 2, p. 130–140, 2006.

CALZADA, Fernando *et al.* ANTIPROTOZOAL AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF DECACHAETA INCOMPTA. *Revista Latinoamericana de Química*, v. 37, n. 2, p. 97–103, 2009.

CAPELLO, Tabata M *et al.* Chemical composition and in vitro cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. *Natural product communications*, v. 10, n. 2, p. 285–8, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25920262>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

CÁRDENAS, L C *et al.* The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta medica*, v. 59, n. 1, p. 26–7, fev. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8441777>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

CASE, Ryan J *et al.* Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006.

CASSEL, Eduardo *et al.* Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO₂. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 39, n. 12, p. 4803–4805, 2000. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034424020&partnerID=tZOtx3y1>>.

CASTAÑEDA, Martha *et al.* Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*, v. 13, n. 33, p. 165–166, 2007. Disponível em: <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4814742>>.

CASTELO, A.V.M.; MENEZZI, C.H.S. Del; RESCK, I.S. Seasonal Variation in the Yield and the Chemical Composition of Essential Oils from Two Brazilian Native Arbustive Species. *Journal of Applied Sciences*, v. 12, n. 8, p. 753–760, 1 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2012.753.760>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

CASTELO, Ana Virgínia Montenegro; DEL MENEZZI, Cláudio Henrique Soares; RESCK, Ines Sabioni. Yield and spectroscopic analysis (1H, 13C NMR; IR) of essential oils from four plants of the Brazilian Savannah. *Cerne*, v. 16, n. 4, p. 573–584, 2010. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79952301329&partnerID=40&md5=8826c1fb2bd3f6f6de44607a1f9f7172>>.

CASTRO, Luiz Osório De; RAMOS, Rosa Lúcia Dutra. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. *Boletim Técnico da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAgro)*, v. 11, p. 1–28, 2003.

CESTARI, Sílvia Helena *et al.* Intestinal Anti-Inflammatory Activity of *Baccharis dracunculifolia* in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, v. 2011, p. 524349, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592480>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

CHARNEAU, Sébastien *et al.* In vitro investigation of Brazilian Cerrado plant extract activity against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei gambiense*. *Natural product research*, n. August, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222897>>.

CHINCHILLA-CARMONA, Misael *et al.* Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 84, n. 1, p. 115–123, 2011.

CITÓ, A; COSTA, Fb; LOPES, Jad. Identificação dos constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). *Revista Brasileira de ...*, n. Figura 1, p. 4–7, 2006. Disponível em: <http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06_3/artigo2_v8_n4.pdf>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos - M38-A*. . [S.l: s.n.]. , 2002a

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição -M27-A2*. . [S.l: s.n.]. , 2002b

CONOVER, Matt S. *et al.* Inflammation-Induced Adhesin-Receptor Interaction Provides a Fitness Advantage to Uropathogenic *E. coli* during Chronic Infection. *Cell Host & Microbe*, v. 20, n. 4, p. 482–492, 2016.

CORREA-ROYERO, Julieth *et al.* In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils

and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 5, p. 734–741, 2010.

COSTA, Olívia Bueno Da; DEL MENEZZI, Cláudio Henrique Soares; BENEDITO, Luiz Eduardo Celino; RESCK, Inês Sabioni; VIEIRA, Roberto Fontes; RIBEIRO BIZZO, Humberto. Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. *International Journal of Forestry Research*, v. 2014, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijfr/2014/982576/>>. Acesso em: 17 set. 2016.

COSTA, Olívia Bueno Da; DEL MENEZZI, Cláudio Henrique Soares; BENEDITO, Luiz Eduardo Celino; RESCK, Inês Sabioni; VIEIRA, Roberto Fontes; RIBEIRO BIZZO, Humberto; *et al.* Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime. *International Journal of Forestry Research*, v. 2014, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijfr/2014/982576/>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

COSTA, Deomar P. *et al.* Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *eugenia uniflora* leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 5, p. 851–858, 2010.

COSTA, Ligia Maria Cantarino. *Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas da biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores da coleção do Museu Nacional - UFRJ*. 1998. 70 f. Fiocruz, 1998.

CROTEAU, Rodney; KUTCHAN, Toni M; LEWIS, Norman G. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry Molecular Biology of Plants*. [S.l: s.n.], 2000. v. 7. p. 1250–1318. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21671613>>.

DA SILVA FILHO, Ademar *et al.* Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, v. 63, n. 1-2, p. 40–6, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18386486>>.

DA SILVA FILHO, Ademar a; ANDRADE E SILVA, Márcio L; *et al.* Evaluation of analgesic and anti-

inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 56, p. 1179–1184, 2004.

DA SILVA FILHO, Ademar A *et al.* In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytotherapy research : PTR*, v. 22, n. 10, p. 1307–10, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688887>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

DA SILVA FILHO, Ademar a; PIRES BUENO, Paula C; *et al.* In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 56, n. 9, p. 1195–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324490>>.

DA SILVA FILHO, Ademar a. *et al.* Tetrahydrofuran Lignans from *Nectandra megapotamica* with Trypanocidal Activity. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 42–45, 2004.

DALY, D.C. *Burseraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB6593>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

DAVID, Michael Z; DAUM, Robert S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 3, p. 616–87, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610826>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

DE ANGELIS, I. *et al.* In vitro toxicity of some cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, v. 24, n. 6, p. 477–479, 1986.

DE ASSIS LAGE, Tiago Coelho *et al.* Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, v. 148, p. 24–29, 2015.

DE CARVALHO, Loretta Ennes *et al.* Essential Oils of Protium of the Adolpho Ducke Forest Reserve: *Protium crassipetalum*, *P. heptaphyllum* subs. *ulei*, *P. pilosissimum* and *P.*

polybotryum. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 16, n. 4, p. 551–554, 4 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0972060X.2013.831557>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

DE LIMA, EwelyneMiranda *et al.* Essential oil from the resin of *Protium heptaphyllum*: Chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial activity, and antimutagenicity. *Pharmacognosy Magazine*, v. 12, n. 45, p. 42, 2016. Disponível em: <<http://www.phcog.com/text.asp?2016/12/45/42/176113>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

DE OLIVEIRA, Pollyanna *et al.* Comparative Evaluation of Antiproliferative Effects of Brazilian Green Propolis, Its Main Source *Baccharis dracunculifolia*, and Their Major Constituents Artepillin C and Baccharin. *Planta Medica*, v. 80, n. 06, p. 490–492, 31 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1368298>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

DE SOUSA, João Paulo B. *et al.* Seasonal Variation of the (E)-Nerolidol and Other Volatile Compounds Within Ten Different Cultivated Populations of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 21, n. 4, p. 308–314, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2009.9700179>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

DELLACASSA, E *et al.* Uruguayan essential oils. Part IX. Composition of leaf oil of *Blepharocalyx tweediei* (Hook. et Arn.) Berg var. *tweediei* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 9, n. 6, p. 673–676, 1997. Disponível em: <\\Robsrv-05\reference manager\Articles\7457.pdf>.

DIAZ, Marisa A. N. *et al.* Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 5, p. 724–728, nov. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000500012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 nov. 2016.

DOS SANTOS, Diogo A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, n. 2, p. 543–550, 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874109006400>>.

EDRIS, Amr E. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 4, p. 308–323, abr. 2007.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2072>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

EFFERTH, Thomas. Cancer Therapy with Natural Products and Medicinal Plants. *Planta Medica*, v. 76, n. 11, p. 1035–1036, 27 ago. 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20665401>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

ESPOSITO, S. *et al.* Central venous catheter-related biofilm infections: An up-to-date focus on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 1, n. 2, p. 71–78, jun. 2013. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213716513000271>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

FABRI, R.L *et al.* Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae.

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 13, n. 2, p. 183–189, 2011. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 28 nov. 2016.

FERRACINI, V.; *et al.* Essential oils of seven Brazilian Baccharis: a prospective approach on their ecological role. 1996, [S.l: s.n.], 1996. Disponível em:

<<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=12572&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22LEITAO FILHO, H.F.%22&qFacets=autoria:%22LEITAO FILHO, H.F.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>.

FERRAZ, Elza de Oliveira. *Composição química e atividade biológica de espécies de nectandra e stevia rebaudiana*. 2015. 66 f. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2015.

FERREIRA, M. I. *Atividade diurética dos extratos aquoso e etanólico de Bugre (Hedyosmum brasiliense Miq .) e seus efeitos na pressão arterial média em testes pré-clínicos*. 2008. UNESP, 2008.

FERRONATTO, Regina *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de*

Farmacognosia, v. 17, n. 2, p. 224–230, jun. 2007. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000200016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)

695X2007000200016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 25 nov. 2016.

FERRONATTO, Regina *et al.* Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por

Baccharis dracunculifolia d. c. e *Baccharis uncinella* d. c. (asteraceae). *Arquivos de Ciências da*

Saúde da UNIPAR, v. 10, n. 2, p. 67–70, 2006.

FILHO, A.A. da Silva *et al.* In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of

phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia*, v. 80,

n. 8, p. 478–482, 2009. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X0900135X>>.

FLORÃO, Angela *et al.* Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. *Journal of Essential Oil Research*, v. 24, n. 6, p. 561–570, dez. 2012.

Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2012.728081>>.

Acesso em: 28 nov. 2016.

FONSECA, M. C M *et al.* Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de

fitopatógenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 1, p. 45–50, 2015.

FREIXA, Blanca *et al.* Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants.

Phytotherapy Research, v. 12, p. 427–430, 1998.

FRISCHKORN, C. G B; FRISCHKORN, H. E.; CARRAZZONI, E. Cercaricidal activity of some essential

oils of plants from Brazil. *Naturwissenschaften*, v. 65, n. 9, p. 480–483, 1978. Disponível em:

<<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0018079845&partnerID=tZOtx3y1>>.

FRIZZO, Caren D. *et al.* Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis*

dracunculifolia DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour and Fragrance*

Journal, v. 23, n. 2, p. 99–106, mar. 2008. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.1862>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

FUKUDA, Mamoru *et al.* Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia*

(Asteraceae) and their cytotoxic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, n. 10, p.

1465–1468, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015994>>.

FURLÁN, Ricardo *et al.* Constituents of the Essential Oil from Leaves and Seeds of *Blepharocalyx tweediei* (Hook, et Arn.) Berg and *B. gigantea* Lillo. *Journal of Essential Oil Research*, v. 14, n. 3, p. 175–178, 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2002.9699815>>.

GALVÃO, Livia Câmara de Carvalho *et al.* Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/751435/>>.

GARCEZ, Fernanda R. *et al.* Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 407–411, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200026&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 29 nov. 2016.

GARNEAU, François-X. *et al.* Essential oils from Bolivia. XIII. Myrtaceae: *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth.) O. Berg. *Journal of Essential Oil Research*, v. 25, n. 3, p. 166–170, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2012.744702>>.

GAUTAM, Nandini; MANTHA, Anil K.; MITTAL, Sunil. Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–23, 2014.

GODINHO, Wilson M. *et al.* Volatile constituents from leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg (Myrtaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 13, n. 3, p. 249–253, 2014.

GODINHO, Wilson Muanis. *Estudo da variação sazonal e circadiana da composição química do óleo essencial de Blepharocalyx salicifolius (Kunth) O. Berg.* 2011. 208 f. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2011.

GÓMEZ, C C Estanislao *et al.* Decatropis bicolor (Zucc .) Radlk essential oil induces apoptosis of the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1136-7>>.

GONÇALVES, Ana Elisa *et al.* The antidepressant-like effect of Hedyosmum brasiliense and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology*, v. 674, n. 2-3, p. 307–314, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.11.009>>.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Cassiano Felipe *et al.* Possible mechanisms of Pseudomonas aeruginosa-associated lung disease. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 306, n. 1, p. 20–28, jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26652129>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

GRECCO, Simone dos S. *et al.* Chemical composition and in vitro cytotoxic effects of the essential oil from Nectandra leucantha leaves. *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 1, p. 133–137, 2 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339603>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

GRIFFIN, Shane G.; WYLLIE, S. Grant; MARKHAM, Julie L. Role of the Outer Membrane of Escherichia coli AGI 00 and Pseudomonas aeruginosa NCTC 6749 and Resistance/Susceptibility to Monoterpenes of Similar Chemical Structure Downloaded. *Journal of Essential Oil Research*, v. 13, n. 5, p. 380–386, 2001.

GUIMARÃES, Natalia S.S. *et al.* Baccharis dracunculifolia, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 3-4, p. 1091–1097, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511006016>>.

GULERIA, Sanjay *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of Eucalyptus teretecornis grown in north-western Himalaya against Alternaria alternata. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, v. 21, n. 1, p. 44–50, 30 jan. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13562-011-0073-2>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

GUSMAN, Grasielle Soares; BITTENCOURT, Alexandre Horácio Couto; VESTENA, Silvana. Alelopatia de Baccharis dracunculifolia DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 30, n. 2, 29 maio 2008. Disponível em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/3592>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

HABERMANN, E; IMATOMI, M; *et al.* Antioxidant activity and phenol content of extracts of bark , stems , and young and mature leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O . Berg. 2016.

HABERMANN, E; PONTES, F C; *et al.* Phytotoxic potential of young leaves from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O . Berg (Myrtaceae). v. 76, n. 2, p. 531–538, 2016.

HAMMAMI, Inès; KAMOUN, Nesrine; REBAI, Ahmed. Biocontrol of *Botrytis cinerea* with essential oil and methanol extract of *Viola odorata* L. flowers. *Archives of Applied Science Research*, v. 3, n. 5, p. 44–51, 2011. Disponível em: <www.scholarsresearchlibrary.com>. Acesso em: 11 jan. 2017.

HEIDEN, G.; SCHNEIDER, A. *Baccharis* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB5177>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

HEMAISWARYA, Shanmugam; KRUTHIVENTI, Anil Kumar; DOBLE, Mukesh. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, v. 15, n. 8, p. 639–652, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599280>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

HERNÁNDEZ, Jehison Jiménez *et al.* Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 210, p. 107–117, 12 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28811222>>. Acesso em: 6 nov. 2017.

HOET, Sara *et al.* Antitrypanosomal Compounds from the Leaf Essential Oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, v. 72, n. 05, p. 480–482, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557466>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

HOLANDA PINTO, S. A. *et al.* Anti-inflammatory effect of α , β -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, v. 16, n. 1, p. 48–52, 1 fev. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10787-007-1609->

x>. Acesso em: 15 nov. 2016.

HOLE, Camaron; WORMLEY, Floyd L. Innate host defenses against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 202–211, 27 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26920880>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

HOLETZ, Fabíola Barbiéri *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=12471432&lang=es&site=ehost-live>>.

HUSOY, T; SYVERSEN, T; JENSSEN, J. Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 7, n. 2, p. 149–54, mar. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732183>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

IBANEZ, F; ZOPPOLO, R. Assessment of allelopathic properties of *Baccharis dracunculifolia* DC in laboratory and field conditions. *Allelopathy Journal*, v. 28, n. 1, p. 77–85, 2011.

IMATOMI, Maristela. Estudo alelopático de espécies da família myrtaceae do cerrado. p. 88, 2010.

IOFI WORKING GROUP ON METHODS OF ANALYSIS. Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour and Fragrance Journal*, v. 26, n. 5, abr. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.2061>>. Acesso em: 3 dez. 2016.

JOHANN, S *et al.* Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, v. 50, n. 8, p. 843–851, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22548242>>.

JOHANN, S. *et al.* Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against

clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 632–637, 2007.

JOHANN, Susana *et al.* Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmaceutical biology*, v. 48, n. 4, p. 388–396, 2010. Disponível em: <[10.3109/13880200903150385\nhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=48748124&lang=es&site=ehost-live](http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=48748124&lang=es&site=ehost-live)>.

KABIR, M. Anaul; AHMAD, Zulfiqar. Candida Infections and Their Prevention. *ISRN Preventive Medicine*, v. 2013, p. 1–13, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/763628/>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro818>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

KIRCHNER, K.a *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 5, p. 692–699, 2010. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78650293027&partnerID=40&md5=871dd3e854d05ea1364ca62be890873e>>.

KLOPELL, Fernando Canani *et al.* Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 62, n. 7-8, p. 537–542, 2007.

KOKOSKA, L. *et al.* Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, n. 1, p. 51–53, 2002.

KOŁACZKOWSKA, Anna; KOŁACZKOWSKI, Marcin. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 6, p. 1438–1450, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26801081>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

LAGO, João Henrique G *et al.* Artigo. v. 31, n. 4, p. 727–730, 2008.

LANG, Gudrun; BUCHBAUER, Gerhard. *A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal*. [S.l: s.n.], 2011

LANG, Gudrun; BUCHBAUER, Gerhard. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 27, n. 1, p. 13–39, 2012.

LEE, S J *et al.* Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, v. 91, n. 1, p. 131–137, 2005. Disponível em: <<Go to ISI>://000226353800019>.

LEE, Adrian V; OESTERREICH, Steffi; DAVIDSON, Nancy E. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 107, n. 7, p. djv073, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25828948>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

LEITÃO, Denise Pimenta Da Silva *et al.* Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 27, n. 11, p. 1834–1839, 2004.

LEITMAN, P. *Chloranthaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB6808>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

LEITOLIS, Amanda *et al.* Sesquiterpene lactones from *Hedyosmum brasiliense* induce in vitro relaxation of rat aorta and corpus cavernosum. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 26, n. 3, p. 363–368, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.005>>.

LEMOS, Marivane *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, n. 4, p. 603–608, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1211/jpp.59.4.0017>>.

LIMA-JÚNIOR, Roberto C. *et al.* Attenuation of Visceral Nociception by α - and β -Amyrin, a Triterpenoid Mixture Isolated from the Resin of *Protium heptaphyllum*, in Mice. *Planta Medica*,

v. 72, n. 1, p. 34–39, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2005-873150>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

LIMBERGER, R.P. *et al.* Biological Activities and Essential Oil Composition of Leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. *Pharmaceutical Biology*, v. 39, n. 4, p. 308–311, 29 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1076/phbi.39.4.308.5915>>. Acesso em: 17 set. 2016.

LOAYZA, Ingrid *et al.* Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 2, p. 381–389, 1995.

LOMBARDO, Pamela *et al.* Postharvest Biology and Technology Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 121, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.002>>.

LONGBOTTOM, Chelsea J. *et al.* Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, n. 2, p. 386–392, 2004.

LOPES, N P *et al.* Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. *Journal of ethnopharmacology*, v. 67, n. 3, p. 313–9, 30 nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617066>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

LORENZI, Harri. *Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. [S.l.]: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1992.

LORENZI, Harri. *Árvores brasileiras : manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. ed. [S.l.]: Nova Odessa:Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LOWY, Franklin D. *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709046>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

LUJÁN, María Claudia; PÉREZ CORRAL, Cristina. Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina. *Revista Cubana de*

Farmacia, v. 42, n. 2, p. 0–0, 2008.

MACHADO, R.R.P. *et al.* Screening antimycobacterial activity of *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* and *Pterodon emarginatus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, p. 891–899, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000600891&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 nov. 2016.

MALDANER, Cleiton Luis *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Baccharis dracunculifolia* DC E *Bryophyllum pinnatum* Kurtz. *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*, v. 10, n. 3, p. 49–58, 2015.

MARCHESAN, Eli Danieli *et al.* Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. E *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 10, n. 2, p. 63–66, 2006.

MARIN, Rafaela *et al.* Composição química do óleo essencial obtido de megapotamica (Spreng) Chodat et Hassler do Sul do Brasil. 2009, [S.l: s.n.], 2009.

MARTINEZ-CORREA, Hugo A. *et al.* Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 63, p. 31–39, 2012.

MASSIGNANI, Juliane Jose *et al.* Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytotherapy Research*, v. 23, n. 10, p. 1355–1360, out. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2624>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

MAX ANTHEUNISSE. *plantillustrations.org*. Disponível em: <<http://plantillustrations.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

MELO, Caroline M. *et al.* Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research*, v. 60, n. 7, p. 673–681, 12 jul. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00011-011-0321-x>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

MIAJLOVIC, Helen; SMITH, Stephen G. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*, v. 354, n. 1, p. 1–9, 2014.

MIKUS, Judith; STEVERDING, Dietmar. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue®. *Parasitology International*, v. 48, n. 3, p. 265–269, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA*. . [S.l.: s.n.]. , 2013

MIRANDA, Cíntia Alvarenga Santos Fraga *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 1, p. 213–220, 2015.

MISHRA, Tripti *et al.* Composition and in vitro cytotoxic activities of essential oil of *Hedychium spicatum* from different geographical regions of western Himalaya by principal components analysis. *Natural Product Research*, v. 30, n. 10, p. 1224–1227, 18 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26196318>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

MISSIMA, Fabiane *et al.* Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, v. 59, n. 3, p. 463–8, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331351>>.

MITRA, Robin *et al.* Medicinal plants of Brazil. *Asia-Pacific Biotech News*, v. 11, p. 689–706, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/245058b0>>. Acesso em: 29 out. 2016.

MOBIN, M *et al.* MDGC-MS analysis of essential oils from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) and their antifungal activity against *Candida* specie. *Rev. Bras. Pl. Med. Campinas*, v. 18, n. 2, p. 531–538, 2016.

MOREIRA, Jane J.S. *et al.* Volatile Constituents Composition of *Blepharocalyx salicifolius* Leaf Oil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 11, n. 1, p. 45–48, 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1999.9701067>>.

MORI, M.; AOYAMA, M.; DOI, S. Antifungal constituents in the bark of *Magnolia obovata* Thunb.

Holz als Roh- und Werkstoff, v. 55, n. 2-4, p. 275–278, mar. 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02990563>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

MUNARI, Carla Carolina *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology*, v. 30, n. 1, p. 22–28, 2010.

MUNARI, Carla Carolina *et al.* Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cells. *Planta medica*, v. 74, n. 11, p. 1363–7, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683127>>.

MUNDINA, Marisa *et al.* Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 15, p. 201–205, 2000.

NAKAGAWA-GOTO, Kyoko *et al.* Novel sesquiterpene lactone analogues as potent anti-breast cancer agents. *Molecular Oncology*, v. 10, n. 6, p. 921–937, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1574789116300023>>.

NAKAMURA, Celso V. *et al.* Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 1, p. 61–66, mar. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000100011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 24 jan. 2017.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIBRET, E.; WINK, M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocyimifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*, v. 17, n. 12, p. 911–920, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20359874>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

NIST Livro de Química na Web. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 3 dez. 2016a.

NIST Livro de Química na Web. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>.

NOAL, Charlise Bolson *et al.* In vitro effects of *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) O. Berg on the viability of *Echinococcus ortleppi* protoscoleces. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 59, p. e42, 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28793013>>. Acesso em: 24 nov. 2017.

OF, Region *et al.* PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF GABIROBA (*Campomanesia lineatifolia*) AND MYRTLE (*Blepharocalyx salicifolius*) NATIVE TO THE MOUNTAINOUS. v. 2125, p. 753–757, 2016.

OGUNGBE, Ifedayo; SETZER, William. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads against Protozoan Neglected Diseases—Part III: In-Silico Molecular Docking Investigations. *Molecules*, v. 21, n. 10, p. 1389, 2016. Disponível em:

<<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/10/1389>>.

OLIVEIRA, Carolina Q *et al.* Sesquiterpenoids from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 1, p. 21–29, 2017.

OLIVEIRA, Francisco A. *et al.* Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences*, v. 77, n. 23, p. 2942–2952, out. 2005. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320505005436>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

OLIVEIRA, Francisco de Assis. *Estudo das propriedades farmacológicas da resina de Protium heptaphyllum (Aubl) March e de seus principais constituintes, mistura de alpha e beta amirina*. 2005. 279 f. Universidade Federal do Ceará, 2005.

OLIVEIRA, Francisco de Assis *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research*, v. 49, n. 2, p. 105–111, 2004.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian journal of veterinary research*, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27175144>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

OZASLAN, Mehmet *et al.* Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n.

13, p. 2375–2378, 2011. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>.

PARK, Benjamin J *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, v. 23, n. 4, p. 525–530, 20 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>>. Acesso em: 2 jan. 2017.

PARK, Yong K *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 5, p. 1100–3, 10 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14995105>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

PAROUL, Natalia *et al.* Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* PERS e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Revista perspectiva*, v. 40, n. 151, p. 55–64, 2016.

PARREIRA, Natália A *et al.* Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chemistry & biodiversity*, v. 7, n. 4, p. 993–1001, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397234>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

PASSOS, Xisto S *et al.* Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Caryocar brasiliensis* List of Latin Binomials : v. 41, n. 5, p. 319–324, 2003.

PEDRAZZI, Vinícius *et al.* Herbal mouthwash containing extracts of *Baccharis dracunculifolia* as agent for the control of biofilm: clinical evaluation in humans. *TheScientificWorldJournal*, v. 2015, p. 712683, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874255>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

PEREIRA, Cristiane Aparecida *et al.* Enzymatic Activity, Sensitivity to Antifungal Drugs and *Baccharis dracunculifolia* Essential Oil by *Candida* Strains Isolated from the Oral Cavities of Breastfeeding Infants and in Their Mothers' Mouths and Nipples. *Mycopathologia*, v. 171, n. 2, p. 103–109, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11046-010-9353-y>>.

PERES, Nalu Teixeira de Aguiar *et al.* Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 85, n. 5, p. 657–67, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152790>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; OHARA, Mitsuko Taba. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322005000200018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 2 dez. 2016.

PISSERI, F; BERTOLI, A; PISTELLI, L. Essential oils in medicine: principles of therapy.

Parassitologia, v. 50, n. 1-2, p. 89–91, jun. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18693566>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

PIVA, Maria da Graça. *O caminho das plantas medicinais : estudo etnobotânico*. [S.l.]:

Mondrian, 2002.

PONCI, Vitor *et al.* Neolignans from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) Display in vitro Cytotoxic Activity and Induce Apoptosis in Leukemia Cells. *Molecules*, v. 20, n. 7, p. 12757–12768, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/12757/>>.

PONCIO, SÔNIA. *BIOATIVIDADE DE INSETICIDAS BOTÂNICOS SOBRE *Microtheca ochroloma* Stal (COLEOPTERA : CHRYSOMELIDAE)*. 2010. 0-80 f. Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

PONTES, Wendel José Teles *et al.* Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amazonica*, v. 37, n. 1, p. 103–109, 2007.

PRIPDEEVECH, Patcharee; CHUKEATIROTE, Ekachai. Chemical compositions, antifungal and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Melodorum fruticosum* L. flowers. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 10, p. 2754–2758, 2010.

QUEIROGA, C.L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. *Composition of the essential oil of vassoura*. *J Braz Chem Soc*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://jbcs.sbq.org.br/jbcs/JBCS 1990/Vol 01\(n03\)/v1n3-03.pdf](http://jbcs.sbq.org.br/jbcs/JBCS 1990/Vol 01(n03)/v1n3-03.pdf)>. , 1990

QUEIROGA, Carmen L *et al.* Comparison of the Chemical Composition of the Essential Oil and the Water Soluble Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, v. 20, n. 2, p. 111–114, 2008. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2008.9699967>>.

QUINET, A.; *et al.* *Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB8431>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

RASTREPO, Angela; TOBÓN, Angela Maria; CANO, Luz Elena. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: ELSEVIER: PHILADELPHIA (Org.). . *Principles and practice of infectious diseases*. 8th. ed. [S.l: s.n.], 2015. p. 2995–3002.

RATERA, E.L.; RATERA, M.O. *Plantas de la Flora Argentina empleadas en la medicina popular*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1980.

REIS, Monique Dos; APEL, Miriam Anders. Estudo comparativo da constituição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Nectandra megapotamica* coletada em diferentes períodos. 2013, [S.l: s.n.], 2013.

REITZ, R.; KLEIN R. M.; REIS A. *Projeto Madeira Do Rio Grande do Sul - Sellowia*. Itajaí : [s.n.], 1983. Disponível em: <<https://www.traca.com.br/livro/853271/>>.

REITZ, Raulino. *Flora ilustrada catarinense*. Itajaí : [s.n.], 1965.

RESENDE, Flávia Aparecida *et al.* Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 17, n. 3, p. 2335–50, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22367028>>.

RESENDE, Flávia Aparecida *et al.* Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 634, n. 1-2, p. 112–118, 2007.

REZENDE, Túlio *et al.* Protective Effects of *Baccharis dracunculifolia* Leaves Extract against Carbon Tetrachloride- and Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Experimental Animals. *Molecules*, v. 19, n. 7, p. 9257–9272, 2 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/7/9257/>>. Acesso em: 27 nov. 2016.

RICCI, M. S.; ZONG, Wei-Xing. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist*, v. 11, n. 4, p. 342–357, 1 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614230>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

RIDDELL, R J; CLOTHIER, R H; BALLS, M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 24, n. 6-7, p. 469–71, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3781409>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

ROBERTO, Matheus Mantuanelli *et al.* Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. *Toxicology in Vitro*, v. 33, p. 9–15, 2016.

ROCHEFORT, H *et al.* How to target estrogen receptor-negative breast cancer? *Endocrine-related cancer*, v. 10, n. 2, p. 261–6, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790787>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

RODRIGUES GOULART, H. *et al.* Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 7, p. 2502–2509, 1 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215101>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

ROLÓN, Miriam *et al.* Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, v. 99, n. 2, p. 103–107, 2006.

ROMOFF, Paulete *et al.* Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). *Química Nova*, v. 33, n. 5, p. 1119–1121, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000500021&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 29 nov. 2016.

RUFINO, Maria Do Socorro M *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>>.

RUFINO, Maria S M *et al.* Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts.

Food Research International, v. 44, n. 7, p. 2072–2075, 2011.

RZEPECKA-STOJKO, Anna *et al.* Caffeic Acid Phenethyl Ester and Ethanol Extract of Propolis Induce the Complementary Cytotoxic Effect on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines.

Molecules, v. 20, n. 5, p. 9242–9262, 20 maio 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26007182>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

SALES, Maria Diana Cerqueira *et al.* Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 1, p. 26–31, 2016.

SANTOS, Flávia Almeida *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in health and disease*, v. 11, p. 98, 6 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22867128>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

SAOTOME, K; MORITA, H; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 3, n. 4, p. 317–21, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702298>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

SASAKI, K *et al.* Comparison of cytotoxic effects of chemicals in four different cell types. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 5, n. 5-6, p. 403–6, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732045>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

SCHENKEL, Eloir Pedro *et al.* Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. v. 38, 2002.

SCHER, Jochen M. *et al.* Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S.F. Gray. *Phytochemistry*, v. 65, n. 18, p. 2583–2588, 2004.

SCHOSSLER, Patrícia *et al.* Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 2, p. 277–287, 2009.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532009000200012&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25 nov. 2016.

SELIM, Elham A; AL-FOOTY, Khalid O; AYYAD, Seif-Eldin N. Cytotoxic Isoprenoids from the Red Sea Soft Corals *Sarcophyton glaucum* and *Xenia umbellata*. *JKAU: Sci*, v. 26, n. 2, p. 21–35, 2014.

SHANKAR, Jata *et al.* Influence of 17 β -estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. *PloS one*, v. 6, n. 12, p. e28402, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194832>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

SIANI, Antonio C. *et al.* Volatile Constituents from Oleoresin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research*, v. 11, n. 1, p. 72–74, 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1999.9701075>>.

SILVA, D T *et al.* Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. *Journal of economic entomology*, v. 107, n. 4, p. 1713–20, ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195467>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

SILVA, Luciana Da *et al.* Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 361–367, set. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 jan. 2017.

SILVA, N C C *et al.* Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural product research*, v. 26, n. 16, p. 1510–4, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007687>>.

SIQUEIRA, Ezequias Pessoa De *et al.* Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. v. 20, n. October 2009, p. 416–421, 2010.

SIQUEIRA, Ezequias P. *et al.* Bioactivity of the compounds isolated from *Blepharocalyx salicifolius*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 4, p. 645–651, 2011.

SOBRAL, M. *et al.* *Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB10262>>.

Acesso em: 17 nov. 2016.

SOBRAL, Marianna Vieira *et al.* Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.

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

SOUZA, Vinicius Castro.; LORENZI, Harri. *Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa : Instituto Plantarum, 2005.

STRYJEWSKI, Martin E.; SEXTON, Daniel J. Pseudomonas Aeruginosa Infections in Specific Types of Patients and Clinical Settings. [S.l.]: Springer US, 2003. p. 1–15. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0433-7_1>. Acesso em: 13 jan. 2017.

STURNICH, Branda Gonsalves; SILVA, Rogério Cesar de Lara Da; SILVA, Jaqueline Candido Machado Da. INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS PARA ESPÉCIES VEGETAIS DO GÊNERO Nectandra Brenda Gonsalves Sturnich 1 ; Rogério Cesar de Lara da Silva 2 ; Jaqueline Candido Machado da Silva 3. 2014, [S.l: s.n.], 2014.

STURNICH, Branda Gonsalves; SILVA, Rogério Cesar de Lara. AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARA ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE N. megapotamica (Sprengel) Mez. 2016, [S.l: s.n.], 2016.

SU, Chinyu; BRANDT, Lawrence J. Escherichia coli O157: H7 Infection in Humans. *Annals of Internal Medicine*, v. 123, n. 9, p. 698, 1 nov. 1995. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-123-9-199511010-00009>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

SUSUNAGA, Glória Susunaga. *Estudo químico e biológico da resina produzida pela especie Protium heptaphyllum March. (Burseraceae)*. 1996. 163 f. Universidade do Amazonas, 1996. Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=1694>>

67>.

TAFURT-GARCÍA, Geovanna; MUÑOZ-ACEVEDO, Amner. Metabolitos volátiles presentes en *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. colectado en Tame (Arauca - Colombia). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, v. 11, n. 3, p. 223–232, 2012.

TAKAO, L K; IMATOMI, M; GUALTIERI, S C J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). v. 75, n. 4, p. 948–952, 2015.

TALENTI, Edilberto C.; TAHER, Hugo A.; UBIERGO, Germán O. Constituents of the Essential Oil of *Blepharocalyx tweediei*. *Journal of Natural Products*, v. 47, n. 5, p. 905–906, set. 1984.
Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50035a036>>. Acesso em: 17 set. 2016.

TALWALKAR, Jaideep S.; MURRAY, Thomas S. The Approach to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine*, v. 37, n. 1, p. 69–81, 2016.

TAYLOR, Peter *et al.* Screening of venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. *Phytotherapy Research*, v. 27, n. 4, p. 530–539, 2012.
Disponível em:
<<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=2012082842&lang=es&site=ehost-live>>.

THORMAR, Halldor. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. [S.l.]: J. Wiley, 2011.

TODZIA, Carol A. *Chloranthaceae: Hedyosmum (Flora Neotropica Monograph 48)*. Disponível em: <<http://www.nybgpress.org/Products/3286/chloranthaceae-hedyosmum-flora-neotropica-monograph-48.aspx?bCategory=BIS!FN>>.

TOLARDO, Rogério *et al.* Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, v. 128, n. 1, p. 63–70, 2010. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109007818>>.

TONDOLO, Juliana Simoni Moraes *et al.* Anesthesia and transport of fat snook *centropomus parallelus* with the essential oil of *nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical*

Ichthyology, v. 11, n. 3, p. 667–674, 2013.

TORRES, A M *et al.* Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Nat Prod Commun*, v. 6, n. 9, p. 1393–1396, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941922>>.

TORRES, Ana M. *et al.* Examen del aceite esencial de *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Nees & Mart. ex Nees. 2005, [S.l.]: Universidad Nacional del Nordeste, 2005.

TORRES, Ana María *et al.* *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. *Journal of Essential Oil Research*, v. 26, n. 3, p. 197–203, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2014.882277>>.

TRENTIN, Ana P. *et al.* Antinociception Caused by the Extract of *Hedyosmum brasiliense* and its Active Principle, the Sesquiterpene Lactone 13-Hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Medica*, v. 65, n. 6, p. 517–521, ago. 1999. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-1999-14007>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

Tropicos - Blepharocalyx salicifolius. Disponível em: <<http://tropicos.org/Name/22102059?tab=synonyms>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

Tropicos - Nectandra megapotamica. Disponível em: <<http://tropicos.org/Name/17801556>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

Tropicos -Hedyosmum brasiliense. Disponível em: <<http://tropicos.org/Name/7300006>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

TUCKER, Arthur O.; MACIARELLO, Michael J.; LANDRUM, Leslie R. Volatile Leaf Oils of American Myrtaceae. I. *Blepharocalyx cruckshanksii* (Hook. & Arn.) Niedenzu of Chile and *B. salicifolius* (Humb., Bonpl. & Kunth) Berg of Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, v. 5, n. 3, p. 333–335, 1993. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1993.9698233>>.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*,

v. 11, p. 463–471, jan. 1963. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730180947X>>. Acesso em: 18 set. 2016.

VERGIS, Jess *et al.* Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, n. September 2014, p. 37–41, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915323>>.

VIDO, Denise Lopes Resende. *Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de hedyosmum brasiliense provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)*. 2009. 92 f. Universidade de São Paulo, 2009.

VILLÉN, Judit; BEAUSOLEIL, Sean A.; GYGI, Steven P. Evaluation of the utility of neutral-loss-dependent MS3 strategies in large-scale phosphorylation analysis. *Proteomics*, v. 8, n. 21, p. 4444–4452, 2008.

VIVOT, Eduardo P *et al.* Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, v. 45, p. 165–185, 2012.

VIVOT LUPI, E P *et al.* Screening of antifungal activity of extracts present in Entre Ríos flora species [Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos]. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 43, n. 4, p. 74–84, 2009. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-74049094787&partnerID=40&md5=213e47a65c33fb16f50fe82720a0ba13>>.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine; ZGAINSKI, Eva Maria. *Plant Drug Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-02398-3>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

WEITZMAN, I; SUMMERBELL, R C. The dermatophytes. *Clinical microbiology reviews*, v. 8, n. 2, p. 240–59, abr. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621400>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

WERKA, J.S *et al.* Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, 2007. Disponível em: <<http://www.biodiversitylibrary.org/part/134749>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

WHO. *Leishmaniasis*.

WU, X *et al.* A phytochemical investigation of *Nectandra membranacea* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, v. 1, n. 6, p. 465–468, 2006.

ZANON, Mireille Maria Franco; GOLDENBERG, Renato; MORAES, Pedro Luís Rodrigues De. O gênero *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 23, n. 1, p. 22–35, mar. 2009. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062009000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 25 jan. 2017.

ZOGHBI, Maria das G. B.; MAIA, Jose G. S.; LUZ, Arnaldo I. R. Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research*, v. 7, n. 5, p. 541–543, set. 1995. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.1995.9698581>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ZRIRA, S S *et al.* Essential Oils of Twenty-Seven Eucalyptus Species Grown in Morocco. *J Ess Oil Res*, v. 4, n. January 2015, p. 259–264, 1992.

APÊNDICE A - Identificação dos componentes dos óleos essenciais

Tabela 1 – Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos lineares (C8-C40)

Alcano	Tempo de retenção (min.)
octano (C8)	3,87
nonano (C9)	6,19
decano (C10)	9,62
undecano (C11)	13,76
dodecano (C12)	18,19
tridecano (C13)	22,61
tetradecano (C14)	26,91
pentadecano (C15)	31,01
hexadecano (C16)	34,91
heptadecano (C17)	38,63
octadecano (C18)	42,17
nonadecano (C19)	45,55
eicosano (C20)	48,78
heneicosano (C21)	51,87
docosano (C22)	54,82
tricosano (C23)	57,66
tetracosano (C24)	60,38
pentacosano (C25)	63,01
hexacosano (C26)	65,54
heptacosano (C27)	67,98
octacosano (C28)	70,34
nonacosano (C29)	72,62
triacontano (C30)	74,83
untriacontano (C31)	76,96
dotriacontano (C32)	79,03
tritriacontano (C33)	81,07

Figura 1 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *P. heptaphyllum*.

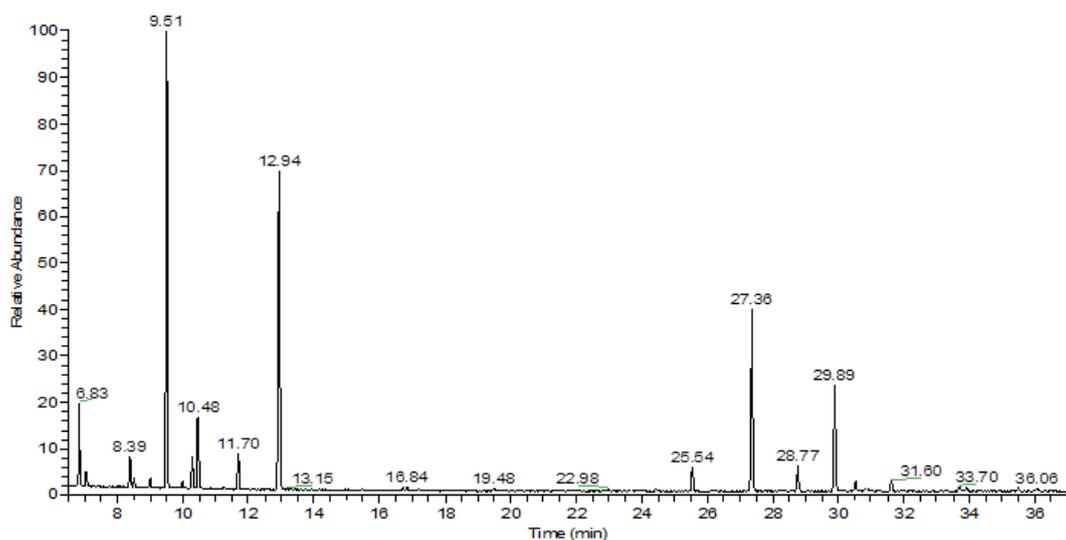


Figura 2 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *H. brasiliense*.

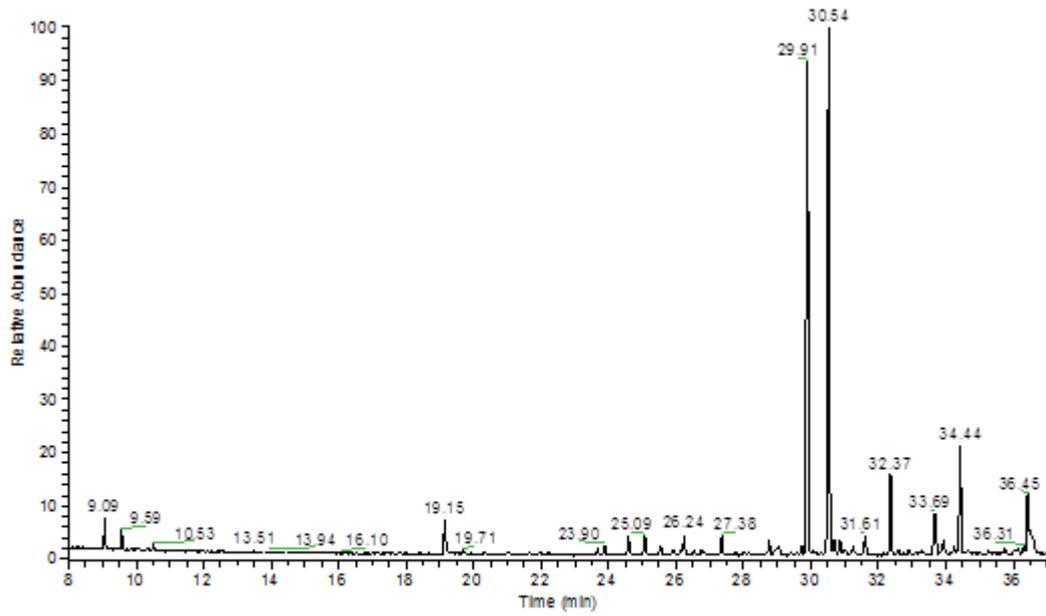


Figura 3 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *B. salicifolius*.

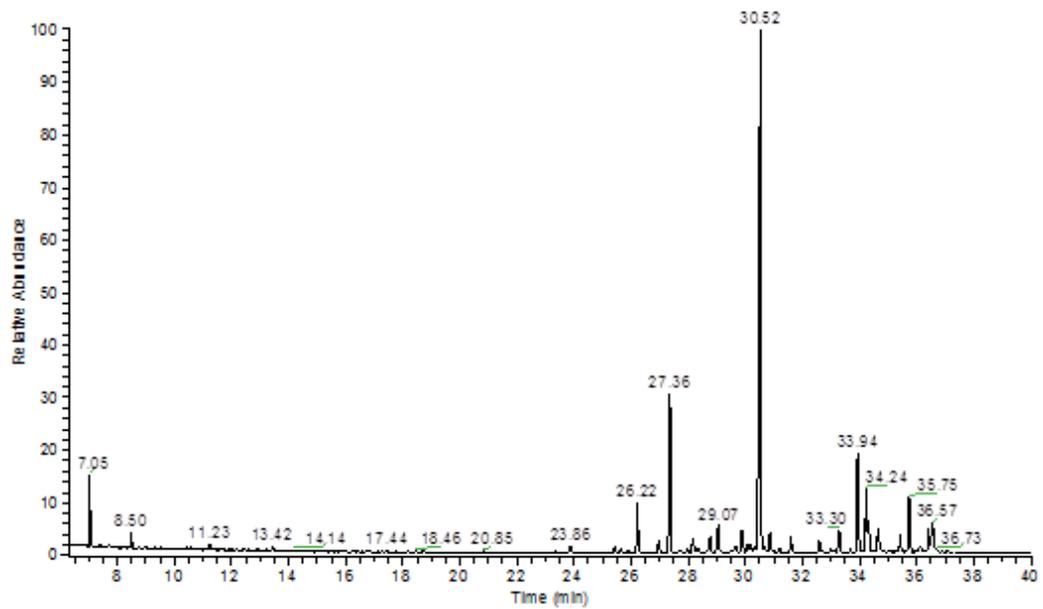


Figura 4 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia*.

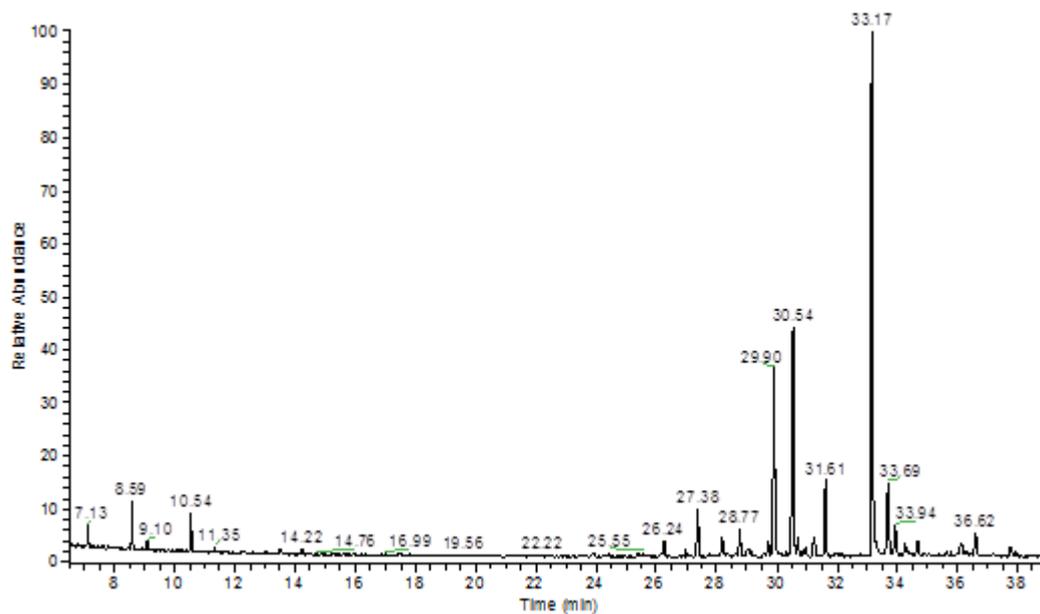
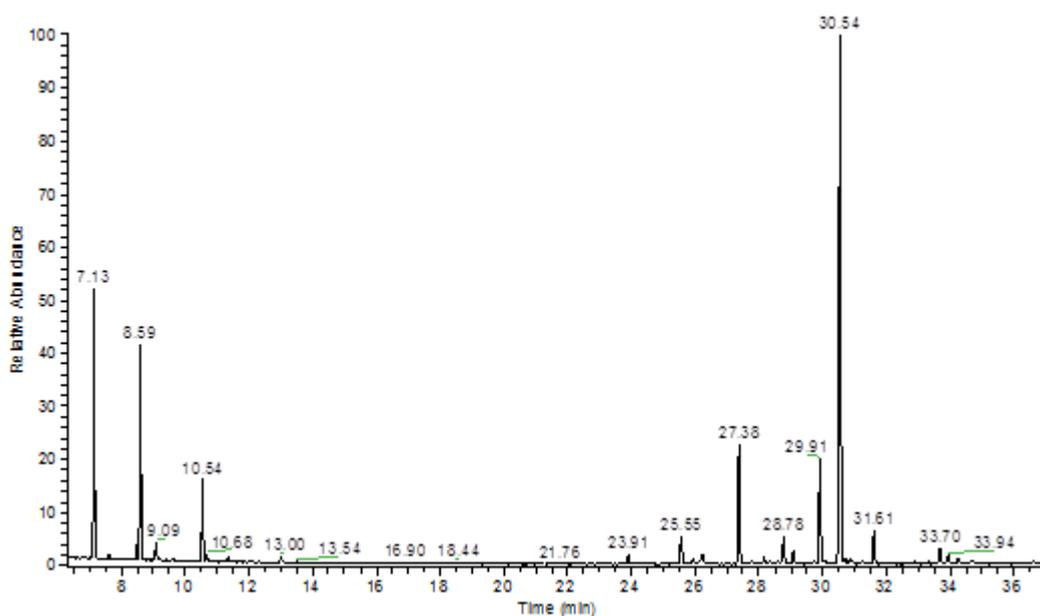


Figura 5 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*.



APÊNDICE B – Tabela de correlação

Tabela 2 – Coeficientes de correlação de Spearman entre os 10 compostos de maior concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de todos os óleos essenciais avaliados e atividades biológicas ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	A	B	C	D	E	
1	1																																					
2	1,000	1																																				
3	0,725	0,725	1																																			
4	1,000	1,000	0,725	1																																		
5	1,000	1,000	0,725	1,000	1																																	
6	0,354	0,354	-0,308	0,354	0,354	1																																
7	1,000	1,000	0,725	1,000	1,000	0,354	1																															
8	1,000	1,000	0,725	1,000	1,000	0,354	1,000	1																														
9	1,000	1,000	0,725	1,000	1,000	0,354	1,000	1,000	1																													
10	1,000	1,000	0,725	1,000	1,000	0,354	1,000	1,000	1,000	1																												
11	-0,707	-0,707	-0,462	-0,707	-0,707	0,000	-0,707	-0,707	-0,707	-0,707	1																											
12	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,707	1																										
13	-0,544	-0,544	-0,947	-0,544	-0,544	0,359	-0,544	-0,544	-0,544	-0,544	0,154	0,363	1																									
14	-0,707	-0,707	-0,359	-0,707	-0,707	-0,500	-0,707	-0,707	-0,707	-0,707	0,500	0,000	0,205	1																								
15	-0,544	-0,544	-0,026	-0,544	-0,544	-0,359	-0,544	-0,544	-0,544	-0,544	0,872	0,363	-0,289	0,564	1																							
16	-0,250	-0,250	0,363	-0,250	-0,250	-0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,354	-0,250	-0,544	0,707	0,725	1																						
17	-0,250	-0,250	0,363	-0,250	-0,250	-0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,354	-0,250	-0,544	0,707	0,725	1,000	1																					
18	-0,250	-0,250	0,363	-0,250	-0,250	-0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,354	-0,250	-0,544	0,707	0,725	1,000	1,000	1																				
19	-0,250	-0,250	0,363	-0,250	-0,250	-0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,354	-0,250	-0,544	0,707	0,725	1,000	1,000	1,000	1																			
20	-0,250	-0,250	0,363	-0,250	-0,250	-0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,354	-0,250	-0,544	0,707	0,725	1,000	1,000	1,000	1,000	1																		
21	-0,395	-0,395	0,229	-0,395	-0,395	-0,783	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	0,224	-0,395	-0,344	0,112	0,459	0,395	0,395	0,395	0,395	0,395	0,395	1																
22	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,354	-0,250	0,725	0,354	-0,544	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	1															
23	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,354	-0,250	0,725	0,354	-0,544	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	1,000	1														
24	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,354	-0,250	0,725	0,354	-0,544	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	1,000	1,000	1													
25	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,354	-0,250	0,725	0,354	-0,544	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	1,000	1,000	1,000	1												
26	-0,395	-0,395	-0,344	-0,395	-0,395	-0,335	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,224	-0,395	0,459	-0,112	-0,344	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	0,500	0,395	0,395	0,395	0,395	1											
27	-0,395	-0,395	-0,516	-0,395	-0,395	-0,224	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,335	-0,395	0,688	0,112	-0,516	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	0,125	0,791	0,791	0,791	0,791	0,875	1										
28	-0,250	-0,250	0,000	-0,250	-0,250	-0,354	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,000	-0,250	0,000	-0,354	0,000	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,791	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,791	0,395	1									
29	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,707	1,000	0,363	0,000	0,363	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,395	-0,250	1								
30	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,707	1,000	0,363	0,000	0,363	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,395	-0,250	1,000	1							
31	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,707	1,000	0,363	0,000	0,363	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,395	-0,250	1,000	1,000	1							
32	-0,250	-0,250	-0,544	-0,250	-0,250	0,707	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	0,707	1,000	0,363	0,000	0,363	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,250	-0,250	-0,250	-0,395	-0,395	-0,250	1,000	1,000	1,000	1						
A	0,707	0,707	0,051	0,707	0,707	0,700	0,707	0,707	0,707	0,707	-0,700	0,000	0,205	-0,600	-0,872	-0,707	-0,707	-0,707	-0,707	-0,707	-0,783	0,354	0,354	0,354	0,354	-0,112	0,112	-0,354	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1				
B	0,395	0,395	0,000	0,395	0,395	0,224	0,395	0,395	0,395	0,395	-0,783	-0,395	0,287	-0,671	-0,918	-0,791	-0,791	-0,791	-0,791	-0,791	-0,125	0,395	0,395	0,395	0,395	0,625	0,625	0,395	-0,395	-0,395	-0,395	-0,395	0,671	1				
C	0,250	0,250	-0,363	0,250	0,250	0,707	0,250	0,250	0,250	0,250	-0,354	0,250	0,544	-0,707	-0,725	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-1,000	-0,395	0,250	0,250	0,250	0,250	0,395	0,395	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250	0,707	0,791	1		
D	0,707	0,707	0,616	0,707	0,707	0,300	0,707	0,707	0,707	0,707	-0,300	0,000	-0,564	-0,900	-0,205	-0,354	-0,354	-0,354	-0,354	-0,354	0,112	-0,707	-0,707	-0,707	-0,707	-0,112	-0,447	0,354	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,300	0,335	0,354	1	
E	0,544	0,544	0,026	0,544	0,544	0,359	0,544	0,544	0,544	0,544	-0,872	-0,363	0,289	-0,564	-1,000	-0,725	-0,725	-0,725	-0,725	-0,725	-0,459	0,544	0,544	0,544	0,544	0,344	0,516	0,000	-0,363	-0,363	-0,363	-0,363	0,872	0,918	0,725	0,205	1	

(1) α -felandreno; (2) isoterpinoleno; (3) E-cariofileno; (4) β -felandreno; (5) α -tujeno; (6) germacreno D; (7) γ -terpineno; (8) p-cimeno; (9) sabineno; (10) α -humuleno; (11) bicilogermacreno; (12) β -eudesmol; (13) espatulenol; (14) globulol; (15) viridiflorol; (16) γ -eudesmol; (17) α -eudesmol; (18) rosifoliol; (19) cubeban-11-ol; (20) palustrol; (21) α -pineno; (22) E-nerolidol; (23) α -Cadinol; (24) epi- α -muurolol; (25) ledol; (26) β -pineno; (27) δ -cadineno; (28) limoneno; (29) citronelol; (30) carotol; (31) δ -Cadineno; (32) (E)- α -bisaboleno; (A) CC₅₀ Ehrlich; (B) CC₅₀ MDA-MB-231; (C) CC₅₀ MCF-10A; (D) Cl₅₀ *L. amazonensis*; (E) CIM *P. brasiliensis*.