



**JULIANA DE ANDRADE SANTIAGO**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS ESPÉCIES DE  
MYRTACEAE: COMPOSIÇÃO QUÍMICA,  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, HEMOLÍTICA,  
ANTITUMORAL, ANTIOCRATOXIGÊNICA E  
CITOGENOTÓXICA**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**JULIANA DE ANDRADE SANTIAGO**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS ESPÉCIES DE MYRTACEAE:  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
HEMOLÍTICA, ANTITUMORAL, ANTIOCRATOXIGÊNICA E  
CITOGENOTÓXICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

**Orientadora**

Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santiago, Juliana de Andrade.

Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocrotogênica e citogenotóxica / Juliana de Andrade Santiago. – Lavras : UFLA, 2015.

222 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Antitumoral. 3. Hemólise. 4. Antioxidante. 5. Citogenotoxicidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**JULIANA DE ANDRADE SANTIAGO**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE TRÊS ESPÉCIES DE MYRTACEAE:  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
HEMOLÍTICA, ANTITUMORAL, ANTIOCRATOXIGÊNICA E  
CITOGENOTÓXICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de setembro de 2015.

Dr. David Lee Nelson	UFVJM
Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira	UFLA
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFSJ
Dra. Marisa Ionta	UNIFAL
Dra. Marisi Gomes Soares	UNIFAL

Dra. Maria das Graças Cardoso

**Orientadora**

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais, José Antonio e Ana Maria, pelo amor incondicional, carinho e dedicação! Vocês não mediram esforços para que esse sonho se realizasse!*

*Ao meu esposo, Wilder, pela presença constante, pelo estímulo, amizade, auxílio, carinho e paciência.*

*Aos meus irmãos, Euler e Glauco, pelo cuidado, incentivo e apoio.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças, pela amizade e exemplo profissional.*

*Externo o meu respeito, afeto e eterna gratidão!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades, pelos dons da paciência, perseverança e, sobretudo, pela fé, que me leva a prosseguir! Obrigada por ter colocado essas pessoas no meu caminho...

Aos meus pais, esposo, irmãos, pelo amor incondicional, pelo incentivo, por acreditarem em mim e fazerem dos meus sonhos, os seus sonhos!

Aos demais familiares e amigos pela amizade, apoio e orações.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pelos ensinamentos, oportunidades, amizade e confiança. Agora compreendo verdadeiramente o significado da palavra orientadora; você não só me orientou profissionalmente, como também me orientou para a vida! Quero levar comigo todos esses aprendizados!

À Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira, pela prestabilidade, dedicação e disponibilidade em contribuir com a nossa pesquisa.

Ao Prof. José Marcello Salabert de Campos (UFJF-MG), pelas análises de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. David Lee Nelson (UFVJM-MG), por sempre contribuir com nossos trabalhos.

À Profa. Dra. Samísia Maria Fernandes Machado (UFS-SE), pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

À Profa. Dra. Marisa Ionta, pela presteza e concessão do Laboratório de Biologia Integrativa (UNIFAL-MG), para a realização dos testes antitumorais. Ao seu orientado, Guilherme, pelo auxílio e amizade.

À Profa. Marisi Gomes Soares, pela gentileza em me receber em sua casa durante o período de estadia em Alfenas e por aceitar participar na avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Gustavo de Lima Guimarães, por me acompanhar desde as atividades de Iniciação Científica, pela amizade e ensinamentos.

À professora Dra. Mariana Mansanares, coordenadora do Herbário ESAL e à funcionária Kelly, pela atenção e presteza na identificação das espécies em estudo.

Aos amigos do laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Maria Luisa, Danúbia, Luana, Anni, Karen, Thaís, Rafaela Brandão, Rafaela Vieira, Lucilene, Leonardo, Richard, Gabriel, Alan, Alex, Bruno, Rodolfo, Lucas e Cleusa, pelo companheirismo, auxílio na condução do experimento e pelo prazer da convivência diária. E aqueles que, atualmente, não estão no laboratório, mas deixaram muitas histórias e muito aprendizado: Marcos, Milene, Cíntia, Juliana Valério, João, Lidiany, Sara, Rafaela Paula, Christiane, Felipe, Bruna, Paula, Jean e Leonardo Luna.

Ao pessoal do Departamento de Biologia, em especial à Iara, Mayra, Franceli, Marcel, Gisele, Felipe, Cristina e Lamartine, pela amizade e ajuda imprescindível.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular, coordenado pelo Prof. Luciano Vilela Paiva, pelas leituras dos géis de eletroforese.

Aos colegas e à técnica do Laboratório de Bioquímica, pelo auxílio nas análises.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio, por doar as sementes utilizadas nos bioensaios vegetais e por sempre se colocar disposto em qualquer situação.

Aos proprietários da Fazenda Guapiara (Auroca-MG), Antônio Carlos Castellani e Arnaldo Ramoska, por doarem as espécies de *Melaleuca*. Ao Adriano José Pavan e Vanete Maria de Melo Pavan, pela prestabilidade e coleta do material vegetal.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica, em especial, à Profa. Dra. Silvana Marcussi, Prof. Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté e

Profa. Dra. Josefina Aparecida de Sousa, pelo exemplo profissional, amizade e apoio durante todo esse período de convivência.

Ao Prof. Dr. Luis Roberto Batista, pelos ensinamentos e por sempre abrir as portas de seu laboratório para que nós realizássemos nossas pesquisas. Às suas orientadas também agradeço pela atenção, paciência e disponibilidade.

Ao pessoal do Horto de Plantas Mediciniais da UFLA, pelo auxílio na coleta dos materiais vegetais.

Aos professores Dr. Antônio Carlos Fraga e Dr. Wilson Roberto Maluf, por me agradecerem com uma bolsa de estudos.

Aos meus colegas de doutorado, pela amizade e harmônica convivência.

Aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e auxílio prestados.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, que me permitiram realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar a composição química e várias atividades biológicas dos OEs de *Melaleuca alternifolia* (folhas e frutos), *Melaleuca quinquenervia* (folhas e frutos) e *Backhousia citriodora* (folhas). Os OEs foram extraídos pela técnica de hidrodestilação e caracterizados quimicamente por CG/EM e CG-DIC. Os testes antitumorais foram realizados em cinco linhagens celulares derivadas de tumores humanos: A549, MCF7, HepG2, U251-MG e HT144. A frequência de células apoptóticas foi analisada por microscopia de fluorescência; as alterações morfológicas, por microscopia de contraste e o conteúdo de DNA, nas diferentes fases do ciclo celular, por citometria de fluxo. Adicionalmente, foram realizados vários ensaios para a avaliação da atividade antioxidante (métodos ABTS, DPPH, radical hidroxil,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, TBARS e complexo fosfomolibdênio). A atividade hemolítica foi avaliada em meio líquido (Ht 0,15%) e em meio sólido. Os óleos extraídos das folhas foram avaliados quanto à inibição da produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* sob duas condições distintas, 15 e 25°C. Os efeitos citogenotóxicos do óleo essencial (OE) de *B. citriodora* foram avaliados sobre *Lactuca sativa*, utilizando ensaios citogenéticos, eletroforese em gel de agarose, citometria de fluxo e teste de TUNEL. Os constituintes majoritários encontrados no OE das folhas de *M. alternifolia* foram  $\gamma$ -terpineno (19,30%) e terpinen-4-ol (56,80%) e, no óleo dos frutos,  $p$ -cimeno (29,48%) e terpinen-4-ol (61,29%). O OE das folhas de *M. quinquenervia* apresentou como constituintes majoritários os compostos  $\alpha$ -pineno (61,37%) e linalol (22,08%), ao passo que, no óleo dos frutos, foram identificados esses mesmos compostos, mas em proporções distintas;  $\alpha$ -pineno (34,49%) e linalol (13,72%), acrescidos de outros componentes;  $p$ -cimeno (17,99%) e 1,8-cineol (11,24%). No OE de *B. citriodora*, foi encontrado o citral (91,19%) como constituinte principal. Analisando a atividade antitumoral, pôde-se observar que o OE dos frutos de *M. alternifolia* reduziu o percentual de células viáveis em 10 e 11%, nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O OE de *B. citriodora* induziu alterações significativas na distribuição das células de linhagens neoplásicas nas diferentes fases do ciclo celular, somada a um aumento de células apoptóticas e alterações morfológicas das células. O OE das folhas de *M. alternifolia* apresentou maior atividade antioxidante perante os métodos fosfomolibdênio (0,84  $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  de ácido ascórbico) e hidroxil (9,7 a 58,9%), sendo, juntamente com os demais óleos de *Melaleuca*, ineficazes para os outros métodos. O OE de *B. citriodora* mostrou-se eficiente ao se utilizar os métodos TBARS (47,9 a 56,3%) e fosfomolibdênio (0,81  $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  de ácido ascórbico). Também apresentou efeitos clastogênicos e aneugênicos em células de *L. sativa*; induziu alterações no ciclo celular e no

conteúdo de DNA, além de ativar a morte das células expostas. Verificou-se que os OEs apresentaram atividade hemolítica em diferentes concentrações, perante ambas as metodologias, com exceção dos OEs de *M. quinquenervia*, que não ocasionaram hemólise em meio sólido. Os OEs também induziram a redução da síntese de ocratoxina por *A. carbonarius* e *A. niger*. Assim, os resultados obtidos ampliam o potencial de aplicação dos óleos essenciais de *B. citriodora*, *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*.

Palavras-chave: Produtos naturais. Antitumoral. Hemólise. Antioxidante. Citogenotoxicidade. Ocratoxina.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the chemical composition and various biological activities of the essential oils from *Melaleuca alternifolia* (leaves and fruits), *Melaleuca quinquenervia* (leaves and fruits), and *Backhousia citriodora* (leaves). The EOs were extracted through the hydrodistillation technique and chemically characterized by GC/MS and GC-FID. The antitumor tests were performed in five cell lines derived from human tumors: A549, MCF7, HepG2, U251-MG and HT144. The frequency of apoptotic cells was analyzed by fluorescence microscopy; morphological changes through contrast microscopy, and DNA content, in the different phases of the cell cycle, through flow cytometry. In addition, several tests were performed to evaluate the antioxidant activity (ABTS, DPPH, hydroxyl radical,  $\beta$ -carotene/ linoleic acid, TBARS, and phosphomolybdenum complex). Hemolytic activity was evaluated in liquid medium (0.15% Ht) and solid medium. The oils extracted from the leaves were evaluated for inhibition of ochratoxin production by *Aspergillus niger* and *A. carbonarius* under two different conditions, 15 to 25°C. The cytogenotoxic effects of the essential oil (EO) from *B. citriodora* were evaluated on *Lactuca sativa*, using cytogenetic assays, agarose gel electrophoresis, flow cytometry and TUNEL test. According to chromatographic analysis, the major constituents found in the EO from the leaves of *M. alternifolia* were  $\gamma$ -terpinene (19.30%) and terpinen-4-ol (56.80%), and the oil from the fruit,  $p$ -cymene (29.48%) and terpinen-4-ol (61.29%). The EO from *M. quinquenervia* leaves showed as major constituents the compounds  $\alpha$ -pinene (61.37%) and linalool (22.08%) while in the fruits the same compounds have been identified, but in different proportions:  $\alpha$ -pinene (34.49%) and linalool (13.72%), plus other components;  $p$ -cymene (17.99%) and 1,8-cineole (11.24%). In EO from *B. citriodora* citral was found (91.19%) as the main constituent. Analyzing the antitumor activity, it was observed that the fruit EO from *M. alternifolia* reduced the percentage of viable cells in 10 and 11% at concentrations of 100 and 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The EO from *B. citriodora* induced significant changes in the distribution of neoplastic cell lines in different phases of the cell cycle, in addition to an increase of apoptotic cells and morphological change of the cells. The EO from the leaf of *M. alternifolia* showed a higher antioxidant activity to the methods phosphomolybdenum (0.84  $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  ascorbic acid) and hydroxyl (from 9.7% to 58.9%), and were, along with other oils from *Melaleuca*, ineffective through the other methods. The EO from *B. citriodora* showed efficient when using the TBARS methods (47.9 to 56.3%) and phosphomolybdenum (0.81  $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  ascorbic acid). The oil also showed clastogenic and aneugenic effects on *L. sativa* cells; induced changes in cell cycle and DNA content, in addition to activating the death of the treated cells. It

was found that EOs had hemolytic activity at different concentrations to both methods, except the EOs from *M. quinquenervia*, which did not cause hemolysis in a solid medium. The EOs also induced the reduction of synthesis of ochratoxin by *A. carbonarius* and *A. niger*. Thus, the results expand the potential application of essential oils from *B. citriodora*, *M. alternifolia* and *M. quinquenervia*.

Keywords: Natural products. Antitumor. Hemolysis. Antioxidant. Cytogenotoxicity. Ochratoxin.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Diagrama esquemático relacionado à produção de compostos voláteis de uma planta. 1,3- polinizadores; 2,4- herbívoros; 5-dispersores de sementes; 6- predadores/parasitas; 7-bactérias; 8-competidores.....	25
Figura 2	Substâncias naturais produzidas pelos metabolismos primários e secundários.....	26
Figura 3	Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato.....	30
Figura 4	Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5-P mevalonato.....	32
Figura 5	Biossíntese de terpenos a partir da formação dos blocos isoprenoides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalipirofosfato (DMAPP).....	34
Figura 6	Formação do ácido chiquímico a partir da condensação da eritrose-4-fosfato e do fosfoenolpiruvato.....	36
Figura 7	Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.....	37
Figura 8	Aspecto geral das plantas em estudo: A- <i>Melaleuca alternifolia</i> (Cav.) S.T. Blake. B- <i>Melaleuca quinquenervia</i> (Maiden & Betche) Cheel.....	39
Figura 9	Aspecto geral da espécie <i>Backhousia citriodora</i> .....	43
Figura 10	Reação de Haber-Weiss (A) e reação de Fenton (cobre ou ferro) (B).....	44
Figura 11	Esquema geral do processo de peroxidação lipídica.....	45
Figura 12	Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante.....	49
Figura 13	Reação de oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	50
Figura 14	Estabilização do radical DPPH por um antioxidante.....	51
Figura 15	Reação de redução do molibdênio por um composto antioxidante.....	53
Figura 16	Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico.....	54
Figura 17	Reação de Fenton.....	54
Figura 18	Esquema do ciclo celular de uma célula cancerosa.....	57
Figura 19	Estrutura do MTS e o produto formado após redução pelo metabolismo de células viáveis.....	64
Figura 20	Estrutura química da ocratoxina A.....	68

## ARTIGO 1

- Figura 1 Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinaquenervia*. (1)  $\alpha$ -pineno; (2)  $p$ -cimeno; (3) 1,8-cineol; (4) linalol; (5)  $\gamma$ -terpineno; (6) terpinen-4ol..... 99
- Figura 2 Gráfico biplot PC1 x PC2 X PC3 dos loadings e scores para os óleos essenciais de duas espécies do gênero *Melaleuca*, em relação aos diferentes teores dos seus constituintes químicos..... 100
- Figura 3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia* determinada por meio de diferentes ensaios: (1) ABTS; (2) DPPH; (3) Fosfomolibdênio..... 103
- Figura 4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia* determinada por meio de diferentes ensaios: (4) Hidroxil; (5) TBARS; (6) Oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico..... 104

## ARTIGO 2

- Figura 1 Porcentagem de hemólise promovida por diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* sobre eritrócitos íntegros (Ht 0,15%)..... 122
- Figura 2 Diâmetro dos halos formados promovida por diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* em meio sólido..... 123

## ARTIGO 3

- Figura 1 Atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *Backhousia citriodora* (BK) determinada através de diferentes ensaios: (1) ABTS; (2) DPPH; (3) Fosfomolibdênio; (4) TBARS..... 147
- Figura 2 Porcentagem de hemólise promovida por diferentes concentrações do óleo essencial de *B. citriodora* sobre eritrócitos íntegros (Ht 0,15%)..... 148
- Figura 3 Viabilidade celular (%) determinada pelo teste MTS em culturas de células de (1) A549, (2) HepG2 e (3) HT144 tratadas com o óleo essencial de *Backhousia citriodora* em diferentes concentrações por 48h..... 151

Figura 4	Análise do ciclo celular de linhagens tumorais A549 (1 e 2), HepG2 (3 e 4) e HT144 (5 e 6) submetidas ao tratamento com o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> (25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por diferentes períodos (24 e 48h, respectivamente).....	154
Figura 5	Frequência de apoptose das culturas de células das diferentes linhagens: (1) A549; (2) HepG2 e (3) HT144, tratadas com o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> por 24h.....	157
Figura 6	Histogramas referentes aos eventos apoptóticos. (1) A549, (2) HepG2 e (3) HT144.....	158
Figura 7	Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as características morfológicas das linhagens celulares tumorais HepG2 e HT144, após tratamento com o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> , nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por 24 h.....	160
<b>ARTIGO 4</b>		
Figura 1	Estruturas químicas dos compostos geranial (1) e neral (2).	179
Figura 2	Índice mitótico e alterações cromossômicas ocasionadas pela presença do óleo essencial de <i>Bachkousia citriodora</i> (BK).....	180
Figura 3	Aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de <i>L. sativa</i> expostas ao óleo essencial de <i>B. citriodora</i> . A) Cromossomo aderente; B) Ponte; C) Formação de fragmentos; D) Migração tardia; E) C-metáfase; F) Micronúcleo.....	182
Figura 4	Teste TUNEL após tratamento com o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A) Controle (água). B-C) Teste positivo. D-E) Resultado positivo para células em diferentes fases do ciclo celular.....	187
Figura 5	Gel de eletroforese para avaliação da fragmentação do material genético. P= padrão de DNA; C= controle.....	188

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1	Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de <i>Melaleuca alternifolia</i> e <i>Melaleuca quinquenervia</i> .....	98
----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### ARTIGO 3

Tabela 1	Valores de $CI_{50}$ obtidos na análise de viabilidade celular para células tumorais e normal, utilizando o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> .....	152
Tabela 2	Conteúdo de DNA (%) nas diferentes fases do ciclo celular de culturas neoplásicas (A549, HepG2 e HT144) submetidas ao tratamento com o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> (25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24 e 48hs.....	155

### ARTIGO 4

Tabela 1	Alterações das células em divisão tratadas com o óleo essencial de <i>B. citriodora</i> .....	182
Tabela 2	Análise de citometria de fluxo do meristema de <i>L. sativa</i> após tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de <i>B. citriodora</i> .....	185

### ARTIGO 5

Tabela 1	Efeito de óleos essenciais (%) na redução da síntese de OTA.....	205
Tabela 2	Composição química dos óleos essenciais de <i>B. citriodora</i> , <i>M. alternifolia</i> e <i>M. quinquenervia</i> .....	207

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Informações sobre o uso terapêutico do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> contidas nas monografias farmacopeicas.....	40
Quadro 2	Principais componentes do óleo essencial obtido de <i>M. quinquenervia</i> (Quimiotipos I e II).....	41
Quadro 3	Informações sobre o uso terapêutico do óleo essencial obtido de <i>M. quinquenervia</i> .....	42
Quadro 4	Atividade citotóxica de óleos essenciais sobre diferentes linhagens celulares.....	59
Quadro 5	Potencial toxigênico de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> em alimentos.....	68
Quadro 6	Classificação de micotoxinas.....	70

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>PBSA</b>	Ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico
<b>MCF7</b>	Adenocarcinoma mamário
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ABTS</b>	2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)
<b>BLU</b>	Base livre de umidade
<b>BHA</b>	Butil-hidroxi-anisol
<b>HepG2</b>	Carcinoma de fígado
<b>A549</b>	Carcinoma de pulmão
<b>CCD-1059Sk</b>	Células normais de fibroblastos
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Cloreto férrico
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>CG/EM</b>	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
<b>CG-DIC</b>	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
<i>C.d.t.</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>BHT</b>	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>U251-MG</b>	Glioblastoma
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]</b>	Hexacianoferrato (III) de potássio
<b>HT144</b>	Melanona
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
<b>OEs</b>	Óleos essenciais
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline (tampão fosfato)
<b>RENAFITO</b>	Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS
<b>MTS</b>	{sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)]}
<b>Sisvar</b>	Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	22
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	24
2.1	<b>Metabólitos secundários vegetais</b> .....	24
2.2	<b>Generalidades sobre os óleos essenciais</b> .....	27
2.2.1	<b>Biossíntese dos óleos essenciais</b> .....	28
2.3	<b>Plantas da família Myrtaceae: <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>Melaleuca quinquenervia</i> e <i>Bachkousia citriodora</i></b> .....	38
2.4	<b>Radicais livres</b> .....	43
2.4.1	<b>Compostos naturais com potencial antioxidante</b> .....	46
2.4.2	<b>Métodos de análise da atividade antioxidante <i>in vitro</i></b> .....	48
2.4.2.1	ABTS.....	48
2.4.2.2	Metodologia que avalia a proteção do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	49
2.4.2.3	DPPH.....	51
2.4.2.4	Fosfomolibdênio.....	52
2.4.2.5	TBARs.....	53
2.4.2.6	Radical Hidroxil.....	54
2.5	<b>Câncer</b> .....	55
2.6	<b>Compostos antitumorais de origem vegetal</b> .....	58
2.7	<b>Ensaio de citotoxicidade</b> .....	60
2.7.1	<b>Testes hemolíticos</b> .....	60
2.7.2	<b>Métodos colorimétricos</b> .....	62
2.8	<b>Bioensaio em vegetais superiores</b> .....	64
2.9	<b>Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>: produção de micotoxinas</b> .....	66
2.10	<b>Ocratoxina A: potencial cancerígeno</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	87
	<b>ARTIGO 1 ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE <i>Melaleuca alternifolia</i> E <i>Melaleuca quinquenervia</i>: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i></b> .....	88
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	91
2	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	98
3	<b>CONCLUSÃO</b> .....	107
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	108

	<b>ARTIGO 2 ATIVIDADES ANTITUMORAL E HEMOLÍTICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE <i>Melaleuca alternifolia</i> E <i>Melaleuca quinquenervia</i>.....</b>	112
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	115
2	<b>PARTE XPERIMENTAL.....</b>	116
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	120
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	125
	<b>REFERENCIAS.....</b>	126
	<b>ARTIGO 3 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Backhousia citriodora</i>: ENSAIOS ANTIOXIDANTES, HEMOLÍTICOS, CITOTÓXICO E ANTITUMORAL.....</b>	129
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	132
2	<b>MATERIAL E METODOS.....</b>	134
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	145
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	162
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	163
	<b>ARTIGO 4 PROSPECÇÃO DO EFEITO CITOGENOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Backhousia citriodora</i> EM <i>Lactuca sativa</i> L....</b>	168
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	171
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	174
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	179
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	190
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	191
	<b>ARTIGO 5 EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Melaleuca alternifolia</i>, <i>M. quinquenervia</i> E <i>Backhousia citriodora</i> NA SÍNTESE DE OCRATOXINA A POR <i>Aspergillus niger</i> E <i>A. carbonarius</i> ISOLADOS DE UVAS VINÍFERAS TROPICAIS.....</b>	196
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	199
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	201
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	205
4	<b>CONCLUSÃO.....</b>	210
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	211
	<b>REFERENCIAS.....</b>	213
	<b>APENDICE.....</b>	216

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são utilizadas desde a antiguidade para fins alimentares e nutricionais. Geralmente, os componentes farmacologicamente ativos presentes nas plantas são metabólitos secundários sintetizados com o objetivo de defender e preservar esses organismos, agindo como dissuasórios alimentares (ex. os taninos), repelentes (como os alcaloides) e no auxílio da polinização (como os flavonoides e os óleos essenciais - OEs) (SIMÕES et al., 2007).

Os OEs possuem grande aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. São empregados como aromas e fragrâncias, sendo comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas, como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Podem ser utilizados como aditivos alimentares para evitar a proliferação de agentes patogênicos e também como conservantes, visando a prolongar a vida útil dos alimentos durante o armazenamento.

Entretanto, apesar do avanço no conhecimento das potencialidades biológicas e farmacológicas desses óleos, existem muitos aspectos relevantes para serem estudados. Muitos constituintes químicos dos OEs apresentam propriedades citotóxicas, hemolíticas, genotóxicas e carcinogênicas, o que torna importante a sua ampla caracterização, visando a uma melhor compreensão da sua ação em sistemas biológicos distintos, possibilitando a indicação de aplicações seguras, tanto na saúde, quanto na alimentação humana.

As espécies da família Myrtaceae são particularmente ricas em óleos essenciais (CERQUEIRA et al., 2009). Essa família é constituída de 140 gêneros e aproximadamente 4000 espécies, com dois principais centros de desenvolvimento, a América tropical e a Austrália, embora ocorram em outras regiões no mundo (MONTEIRO et al., 2013). Relativamente ao seu grande

número, muitos estudos acerca do potencial biológico de suas espécies devem ser realizados.

Além disso, as espécies vegetais *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* e *Backhousia citriodora* não são oficializadas para uso na forma de droga vegetal notificada, mas se apresentarem evidências científicas suficientes de segurança, eficácia e posologia, poderão fazer parte da RENAFITO e também poderão ser encaminhadas à ANVISA como sugestão/solicitação de inclusão na Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado (LMFRS). Dessa forma, incentiva-se a pesquisa da qualidade dos produtos derivados de plantas, incluindo os estudos químicos e farmacológicos dos seus óleos essenciais (BRASIL, 2009).

Assim, os objetivos desta pesquisa foram determinar a composição química e o potencial biológico dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. quinquenervia* e *B. citriodora* relacionado às suas atividades antioxidante, hemolítica, antiproliferativa, citotóxica e antiocrotogênica.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Metabólitos secundários vegetais**

Todas as fases da vida de um organismo (nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento e morte) são controladas por transformações químicas realizadas pelos metabolismos primário e secundário (BRAZ-FILHO, 2010).

O metabolismo primário é responsável pela síntese de proteínas, lipídeos, carboidratos e outras substâncias importantes que participam da nutrição e dos processos metabólicos essenciais à manutenção da vida do organismo produtor (SIMÕES et al., 2007). Os metabólitos secundários são característicos e específicos para cada indivíduo e, apesar de estarem presentes em pequenas quantidades, asseguram vantagens para sua sobrevivência, garantindo a perpetuação da espécie (BRAZ-FILHO, 2010).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados produtos de excreção do vegetal, no entanto, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do vegetal a seu meio, participando de interações intra e intercelulares do próprio organismo ou com células de outros organismos (Figura 1) (BALDWIN, 2010; BRAZ-FILHO, 2010; SIMÕES et al., 2007).

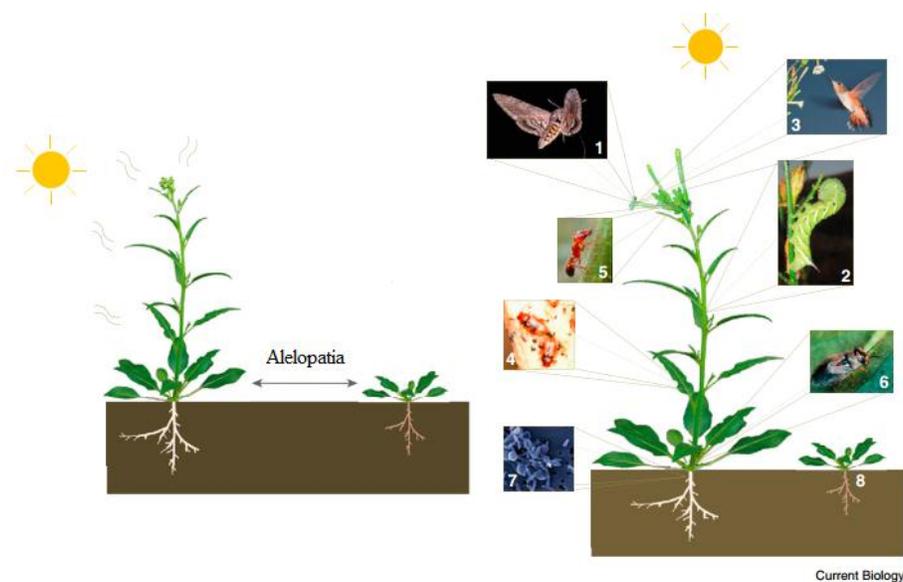


Figura 1 Diagrama esquemático relacionado à produção de compostos voláteis de uma planta. 1 e 3- polinizadores; 2 e 4-herbívoros; 5-dispersores de sementes; 6-predadores/parasitas; 7-bactérias; 8-competidores.  
 Fonte: adaptado de Baldwin (2010).

Os organismos vivos utilizam vias biogénicas para transformações e interconversões químicas de metabólitos do seu acervo vivo e dinâmico. A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, por meio de dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 2). O ácido chiquímico é precursor de cumarinas, alcaloides (derivados dos aminoácidos aromáticos), lignanas, ligninas e fenilpropanoides; compostos que têm em comum a presença de um anel aromático na sua constituição; ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcaloides derivados desses, terpenoides e esteroides (BRAZ-FILHO, 2010; DEWICK, 2009).

As principais biorreações utilizadas em tais processos vitais envolvem reações de substituição nucleofílica, adição eletrofílica, rearranjos de Wagner - Meerwein, condensação aldólica, reação de Claisen, formação da base de Schiff,

reação de Mannich, transformações, carboxilações e descarboxilações, oxidações e reduções (BRAZ-FILHO, 2010).

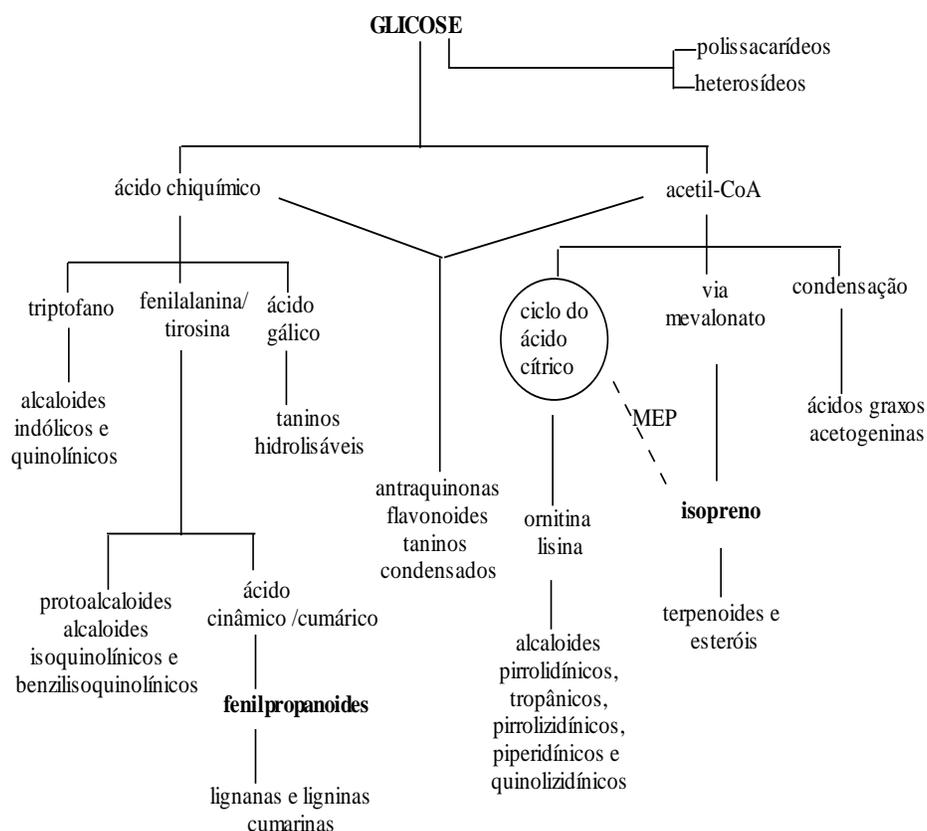


Figura 2 Substâncias naturais produzidas pelos metabolismos primários e secundários.

Fonte: adaptado de Simões et al. (2007).

No grupo de compostos do metabolismo secundário, incluem-se diversas substâncias ativas de importância comercial, não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica e perfumaria, destacando-se os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais.

## 2.2 Generalidades sobre os óleos essenciais

A International Organization for Standardization (ISO) define os óleos essenciais como produtos obtidos, de uma planta ou das suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água); ou para os frutos cítricos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado expressão. O óleo essencial representa apenas uma parte da constituição volátil (essência) passível de ser obtida de uma planta. Com efeito, a componente volátil pode ser extraída por outras metodologias; nesse caso, os extratos obtidos não devem ser designados óleos essenciais (FIGUEIREDO; BARROSO; PEDRO, 2007).

Os óleos essenciais são misturas de natureza complexa, compostos por substâncias voláteis e odoríferas. Geralmente, a maioria apresenta-se sem coloração, ligeiramente amarelada ou azulada, solúveis em solventes orgânicos apolares e com densidade inferior a  $1 \text{ g cm}^{-3}$ . São metabólitos secundários obtidos exclusivamente das plantas e distribuem-se diferentemente em diversos órgãos vegetais, podendo ser encontrados e armazenados em células secretoras especializadas, como os tricomas glandulares, canais oleíferos e cavidades (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham diversas atividades biológicas importantes na proteção das plantas, aumentando suas probabilidades de sobrevivência. Podem atuar na proteção contra perda de água, aumento de temperatura e como inibidores de germinação (alelopatia) (MIRANDA et al., 2014a). Muitas dessas substâncias podem ainda ser utilizadas na proteção de culturas agrícolas contra doenças (GOMES et al., 2014) e pragas (SANTIAGO et al., 2014), com a vantagem de não se acumularem no ambiente e terem um largo espectro de ação, o que diminui o risco de desenvolvimento de estirpes patogênicas resistentes (FIGUEIREDO; BARROSO; PEDRO, 2007;

FUMAGALI et al., 2008). A constituição dos óleos essenciais pode incluir hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos e compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2007). Geralmente, são constituídos por cerca de 20 a 60 componentes em concentrações distintas, sendo caracterizados por dois ou três componentes em concentrações elevadas (20 - 70%), denominados compostos majoritários (BAKKALI et al., 2008).

A composição química dos óleos essenciais de cada espécie vegetal e a concentração de cada princípio ativo são determinadas geneticamente, podendo variar também de acordo com os fatores edafoclimáticos. Os estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Além disso, podem ser influenciados pelo método de cultivo, idade da planta, horário e condições de colheita, tempo de secagem e estocagem (BLANK et al., 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos essenciais são derivados de terpenoides ou fenilpropanoides, que são originados, biogeneticamente, de metabólitos precursores diferentes e gerados por rotas biossintéticas completamente distintas (BANDONI; CZEPAK, 2008).

### **2.2.1 Biossíntese dos óleos essenciais**

Os terpenos constituem um largo grupo de metabólitos naturais, cujo termo é empregado para designar as substâncias derivadas do isopreno (2-metil-1,3-butadieno). São também denominados terpenoides quando possuem elementos adicionais, como o oxigênio.

Segundo Baldwin (2010), as unidades isoprênicas ativas são definidas como os ésteres pirofosfato de isopentila (IPP) e seu isômero alílico, pirofosfato

de dimetilalila (DMAPP), que são originados por duas vias independentes: uma via citosólica ou rota do mevalonato (MVA) e outra plastidial ou rota do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). Essas estruturas básicas constituem os monômeros a partir dos quais originarão os diferentes terpenoides.

A biossíntese dos terpenoides pode ser dividida em 4 etapas: síntese do precursor fundamental, IPP; adições repetitivas do IPP para formação de uma série de homólogos prenil difosfato; ação de enzimas específicas na produção dos esqueletos terpênicos; modificações enzimáticas secundárias dos esqueletos para originar funcionalidade e uma grande diversidade de compostos (DEWICK, 2009).

A via clássica do ácido mevalônico (Figura 3) envolve dois passos de condensação de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas acetil-CoA aciltransferases e hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA) para produzir HMG-CoA. Em seguida, o HMG-CoA é reduzido pela HMG-CoA redutase por um processo que depende de NADPH, formando os ácidos meváldico e mevalônico. Esse último, por sua vez, é convertido a IPP, por meio de duas fosforilações e uma descarboxilação. A IPP isomerase catalisa a conversão de parte do IPP para dimetilalildifosfato (DMAPP) (LÜCKER, 2002).

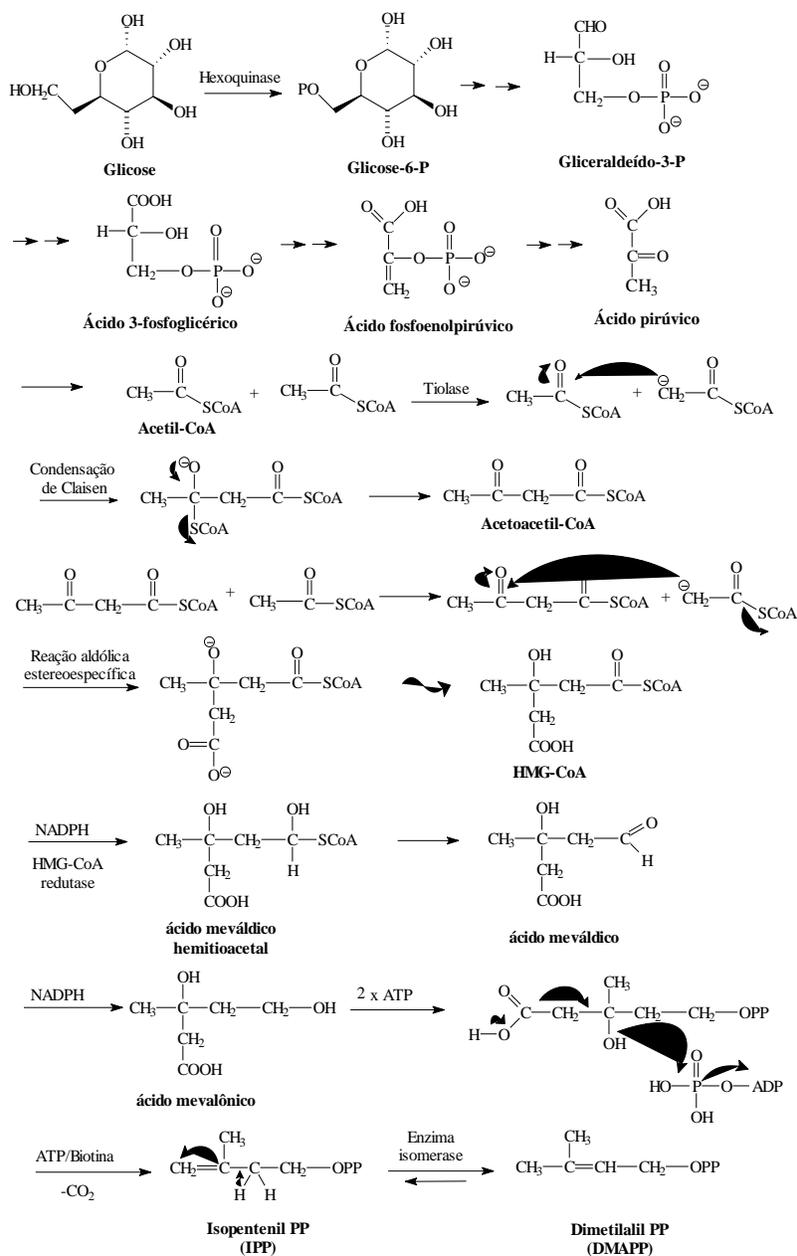
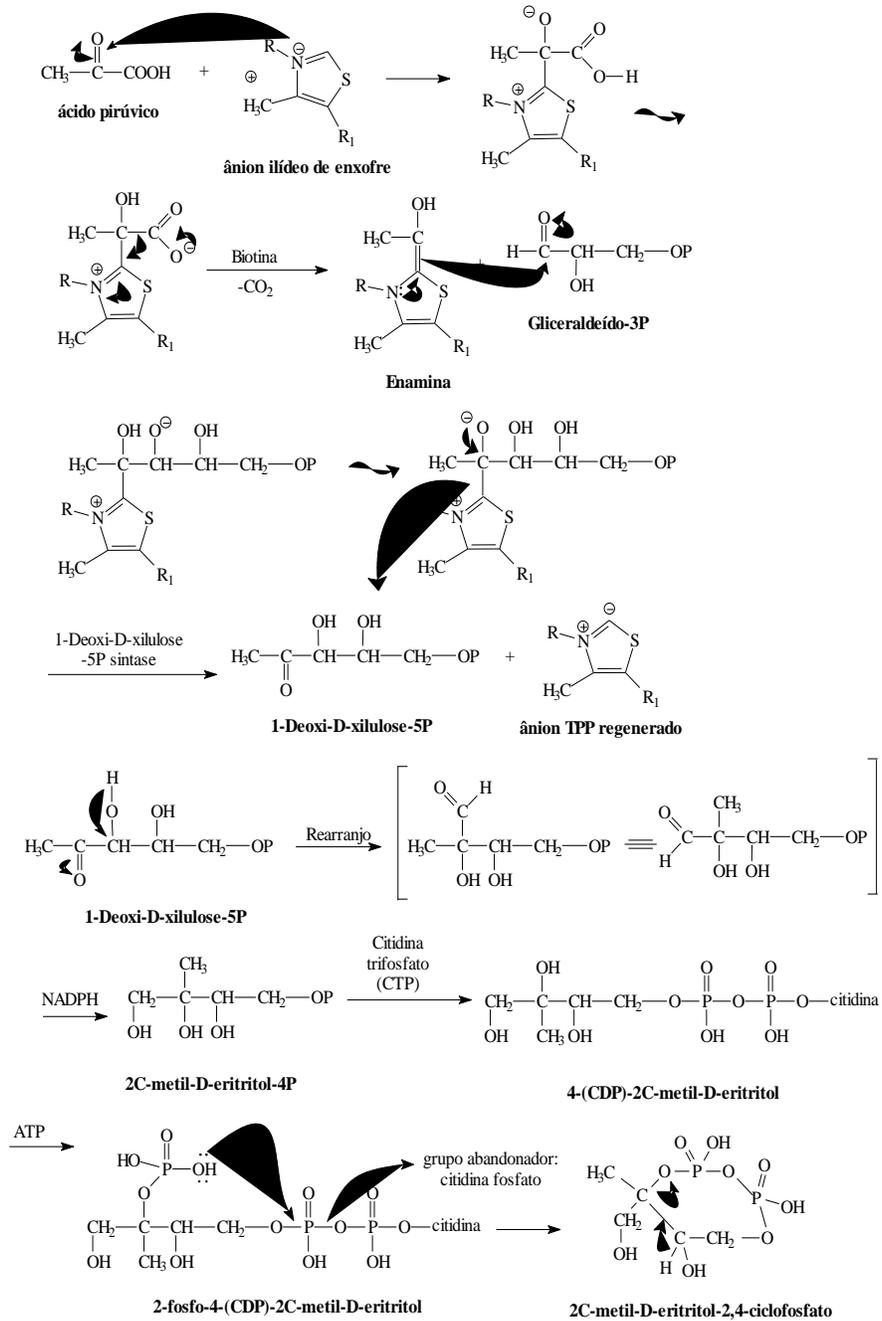


Figura 3 Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato.

Fonte: adaptada de Dewick (2009).

A via do 5-fosfato de 1-deoxi-D-xilulose (DXPS) ou via independente do mevalonato (Figura 4) foi encontrada em bactérias, algas verdes e nos plastos das plantas superiores. Essa via tem como precursor do IPP o composto 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP), formado pela condensação de uma molécula de piruvato com o ânion ilídeo de enxofre e pela reação da enamina com o gliceraldeído-3-fosfato. Foi denominada por via MEP (2C-metil-D-eritritol 4-fosfato), formada pela DOXP-redutoisomerase (DXR) a partir do DOXP. Em seguida, após sucessivas reações, o MEP é convertido no seu último intermediário, que é convertido em IPP e DMAPP. As moléculas de IPP e DMAPP (Figura 5) dão origem ao *trans*-geranilpirofosfato (GPP), o qual é convertido nos diferentes monoterpenos, que representam, geralmente, 90% da composição dos óleos essenciais. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranilgeranil difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente. A formação de neril pirofosfato (NPP) a partir de GPP origina um grande número de esqueletos acíclicos, cíclicos, bicíclicos e tricíclicos. Outros dois isômeros formados a partir do GPP são o linalil pirofosfato (LPP) e o *cis*-nerilpirofosfato (NPP) (formando um esteroisômero *cis*). Esses compostos originam vários monoterpenos acíclicos (DEWICK, 2009).



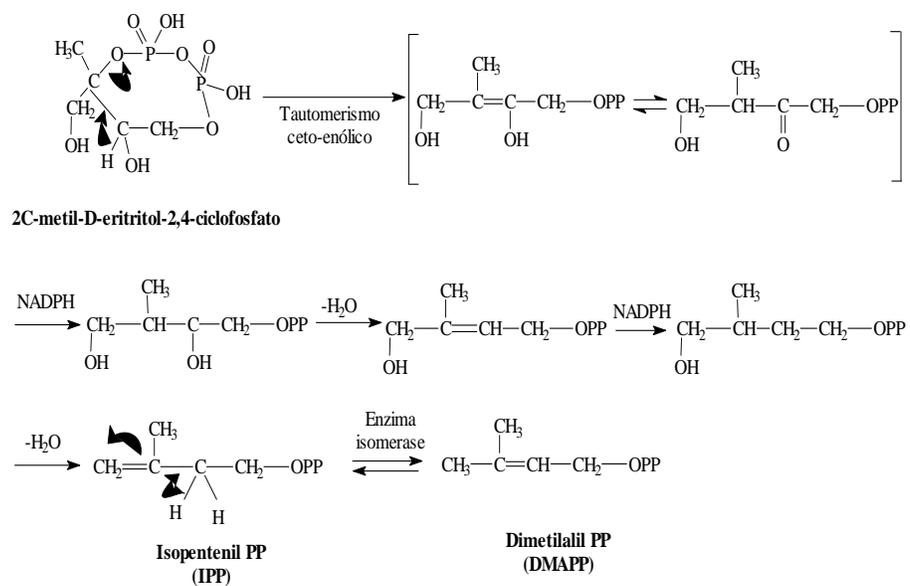


Figura 4 Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5-P mevalonato.

Fonte: adaptada de Dewick (2009).

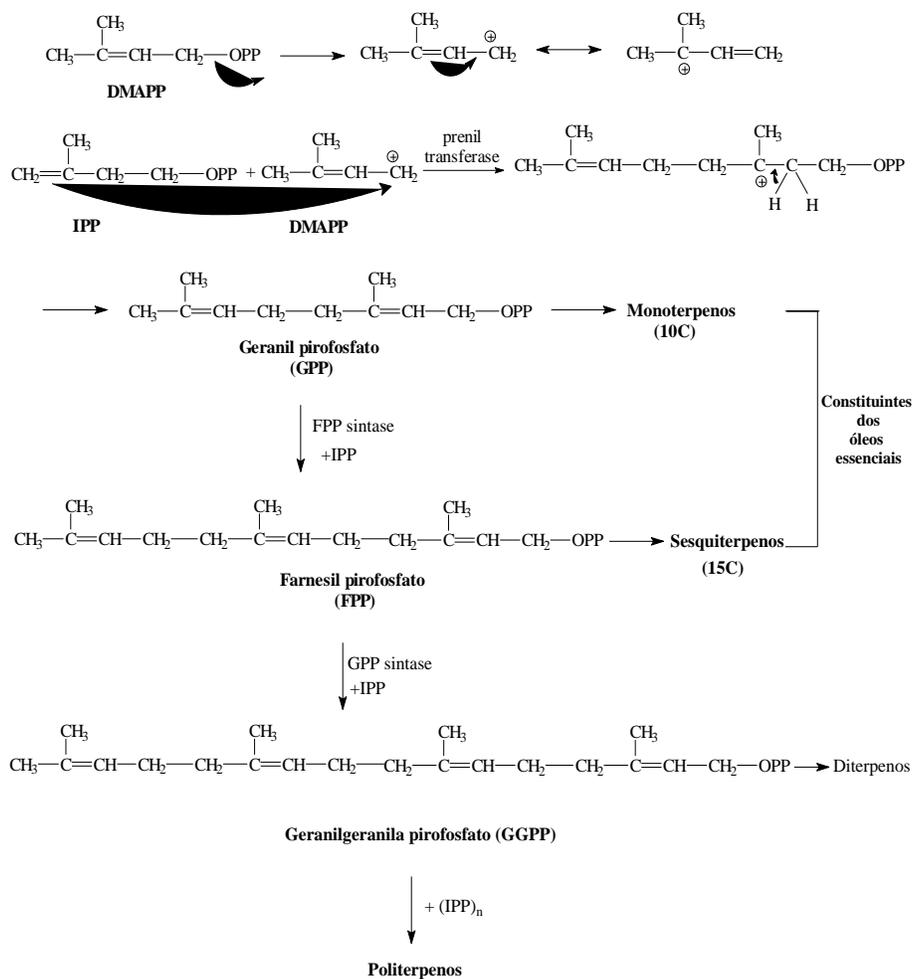


Figura 5 Biossíntese de terpenos a partir da formação dos blocos isoprenoides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalipirofosfato (DMAPP).  
Fonte: adaptada de Dewick (2009).

Além dos terpenoides, os óleos essenciais contêm os fenilpropanoides, compostos aromatizantes que também conferem características organolépticas aos óleos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Apresentam em suas estruturas um anel aromático com uma cadeia lateral composta por três

carbonos, com uma dupla ligação e podem conter um grupo funcional com oxigênio.

Os fenilpropanoides possuem como precursor o ácido chiquímico, o qual é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose; o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato (Figura 6). Pela junção do ácido chiquímico e de uma molécula de fosfoenolpiruvato, ocorre a formação do ácido corísmico (PERES, 2004). O ácido corísmico é responsável por gerar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina, os quais perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico (Figura 7). Esses últimos, por meio de reduções enzimáticas, originam propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, que por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram diversos compostos presentes na constituição de muitos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).



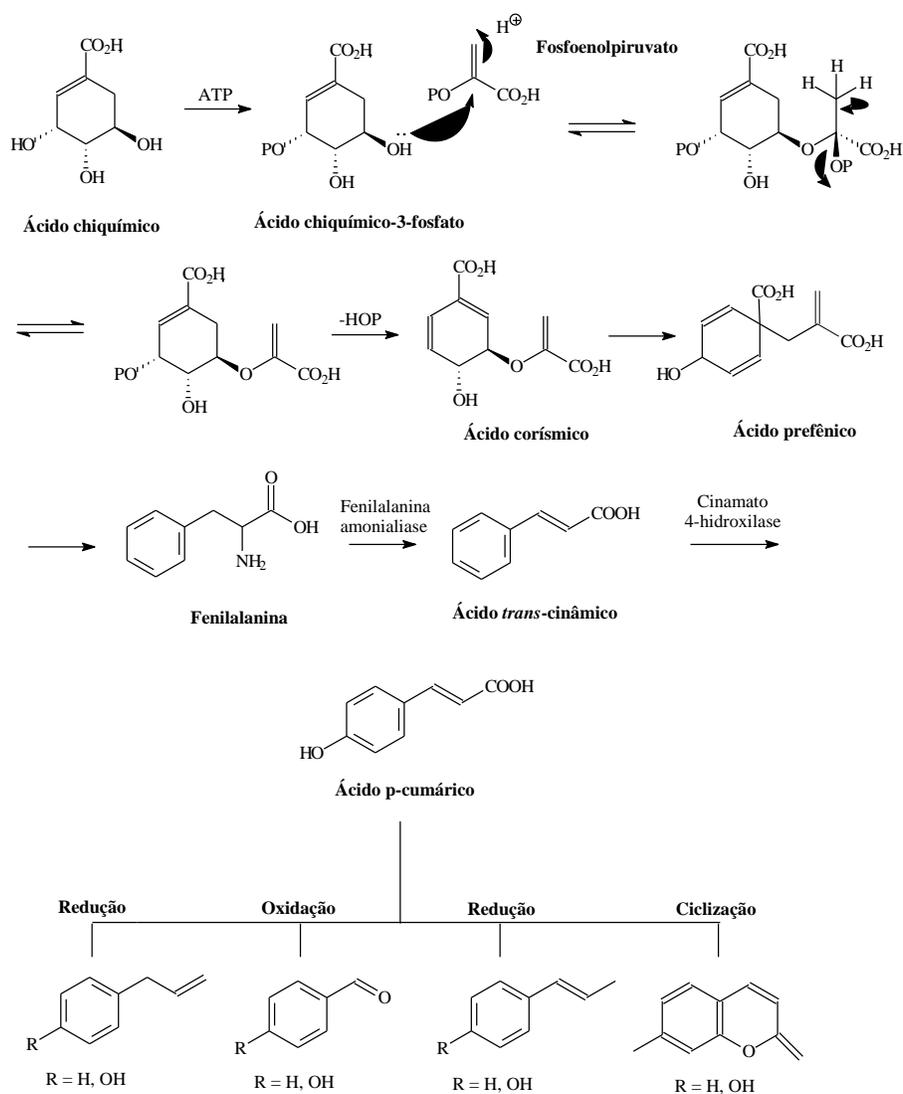


Figura 7 Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.

Fonte: adaptada de Dewick (2009).

### 2.3 Plantas da família Myrtaceae: *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* e *Bachkousia citriodora*

O reino vegetal constitui um amplo reservatório de moléculas bioativas e de consequente importância econômica a serem descobertas. A família Myrtaceae destaca-se no cenário brasileiro e mundial, devido à sua abundância e diversidade. É constituída por aproximadamente 140 gêneros e 4000 espécies, sendo que no Brasil há 48 gêneros e mais de 900 espécies. Está dividida em duas subfamílias: Leptospermoideae, que apresenta espécies com frutos secos e, Myrtoideae, que possui espécies com frutos carnosos. A distribuição da família ocorre predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, concentradas na região neotropical e na Austrália (SOUZA; LORENZI, 2005; MONTEIRO et al., 2013).

O gênero *Melaleuca*, pertencente a essa família, possui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. Esse gênero possui introdução relativamente recente no Brasil, mostrando-se resistente a variações do clima e de solo, podendo ser cultivado em todo o território. Está representado, principalmente, pelas espécies *Melaleuca alternifolia* Cheel, *M. ericifolia* Sm., *M. armillaris* Sm., *M. cajuputi*, *M. leucadendra* (L.) L. e *M. quinquenervia* (LORENZI, 2003; MONTEIRO et al., 2013).

As espécies de *Melaleuca* são importantes plantas medicinais e aromáticas, sendo muito exploradas comercialmente, uma vez que muitas são produtoras de óleos essenciais. No Brasil, as indústrias adquirem tais óleos por meio da importação, os quais são utilizados na formulação de cosméticos, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (CASTRO et al., 2005; MONTEIRO et al., 2013).

Nota-se que, no Brasil, é crescente o interesse de várias indústrias na implantação de cultivos comerciais de espécies de *Melaleuca*, em especial, de *M. alternifolia*. Castro et al. (2005) realizaram um estudo sobre a viabilidade de implantação do cultivo dessa espécie para fins comerciais. Na análise econômica, todos os critérios avaliados apresentaram valores satisfatórios, indicando, com isso, a viabilidade econômica do projeto. Além disso, as espécies de *Melaleuca* cultivadas no Brasil expressam quimiotipos diferentes daqueles encontrados em outros lugares, como na Austrália, podendo ser exploradas para fins comerciais, especialmente quanto à produção de óleos essenciais (MONTEIRO et al., 2013).

A espécie *M. alternifolia* Cheel (Figura 8A), conhecida popularmente como “Tea Tree”, é uma árvore de porte pequeno, de até 7 m de altura. Possui casca fina, folhas simples, coriáceas, agudas lanceoladas e, algumas vezes, em formato de foice, de 1-2,5 cm de comprimento (GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2000).



Figura 8 Aspecto geral das plantas em estudo: A- *Melaleuca alternifolia*. B- *Melaleuca quinquenervia*.

Fonte: A- (Cav.) S.T. Blake. B- (Maiden & Betche) Cheel.

A qualidade comercial do óleo essencial de *M. alternifolia*, denominado como óleo do tipo terpinen-4-ol, deve conter, no mínimo 30% desse composto e, no máximo, 15% de 1,8-cineol (ISO 4730, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO, 2004). O Quadro 1 apresenta aspectos relevantes com relação ao óleo essencial proveniente dessa espécie.

Quadro 1 Informações sobre o uso terapêutico do óleo essencial de *M. alternifolia* contidas nas monografias farmacopeicas.

Espécie	<i>Melaleuca alternifolia</i>
Constituintes principais das folhas e ápice dos ramos	Terpinen-4-ol (30-48%), $\gamma$ -terpineno (10-28%), $\alpha$ -terpineno (5-13%)
Principais indicações	Problemas de pele (acne, bromidrose, furunculose, onicomiose), doenças causadas por <i>Trichomonas vaginalis</i> ou <i>Candida albicans</i> , cistites e cervicites
Dosagens recomendadas	Cosméticos de uso externo: 2% a 3% do óleo essencial Cremes dentais e enxagatatórios bucais: até 0,5% Cremes dermatológicos: até 2% do óleo essencial
Contraindicações	Aplicações sobre a pele inflamada, podendo potencializar a inflamação. Indivíduos com antecedentes de hipersensibilidade a óleos essenciais
Efeitos colaterais	Uso externo- Dermatite de contato Uso interno- Diarreia e, dependendo da dose ingerida, pode provocar toxicidade do sistema nervoso central

Fonte: Monteiro et al. (2013).

A *Melaleuca quinquenervia* (Figura 8B) é uma árvore exótica invasora, adaptada tanto a áreas secas como alagadas. Foi introduzida no sul da Flórida, em grande parte da Austrália no início do século 20, e tornou-se uma das piores plantas invasoras do mundo (MONTEIRO et al., 2013).

Estudando a constituição química do óleo essencial de diferentes quimiotipos de *M. quinquenervia*, Wheeler (2005) encontrou o viridiflorol como

componente majoritário das folhas dessa espécie. Estudos comprovaram que essa espécie pode ocorrer em duas formas químicas distintas ou "quimiotipos" (Quadro 2). O quimiotipo 1 é caracterizado por terpenos acíclicos, apresentando elevadas concentrações do sesquiterpeno *E*-nerolidol (74-95%), sendo também constituída pelo monoterpeneo linalol. Já o quimiotipo 2 contém altas concentrações de terpenos cíclicos, destacando-se o sesquiterpeno viridiflorol (13-66%), os monoterpeneos 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineol (IRELAND et al., 2002; WHEELER; PRATT; GIBLIN-DAVIS, 2007).

Quadro 2 Principais componentes do óleo essencial obtido de *M. quinquenervia* (Quimiotipos I e II).

Quimiotipo	Componentes Principais	Outros Componentes
I	<i>E</i> -nerolidol (95%)	1,8-cineol, $\beta$ -cariofileno, <i>E,E</i> -farnesol, linalol, benzaldeído e $\beta$ -farneseno
II	Viridiflorol (66%)	<i>E</i> -nerolidol, $\alpha$ -pineno, limoneno, 1,8 cineol, $\beta$ -eudesmol, viridifloreno, $\alpha$ -eudesmol, $\alpha$ -eudesmol, $\beta$ -cariofileno e $\beta$ -pineno

Fonte: Monteiro et al. (2013).

O Quadro 3 apresenta informações sobre o óleo de *M. quinquenervia* obtidas a partir das monografias farmacopeicas.

Quadro 3 Informações sobre o uso terapêutico do óleo essencial obtido de *M. quinquenervia*.

Indicações	Secreção trato aéreo superior, tosse e bronquite
Contraindicações	Para uso interno na presença de doença inflamatória do trato gastrointestinal ou ductos biliares e doenças hepáticas severas. Para o uso externo, as preparações contendo o óleo não devem ser usadas na face ou no nariz de bebês e crianças.
Dosagens recomendadas	Uso interno - Dose única ou diária: 0,2g. Gotas nasais: 2-5% em óleo vegetal Uso externo – Preparações 10-30% óleo de <i>M. quinquenervia</i> em óleo vegetal.

Fonte: Monteiro et al. (2013).

A espécie *Backhousia citriodora* (Figura 9) é também originária da Austrália e pertencente à família Myrtaceae. É conhecida popularmente por murta-limão e limão-australiano. Foi descrita pela primeira vez pela empresa alemã Schimmel e Co. em 1888 a partir de um espécime encontrado nas florestas no sudeste do Estado de “Queensland”, na Austrália. O quimiotipo mais comum contém predominantemente citral, mistura isomérica de neral e geranial (BROPHY et al., 1995).

Estudos de Hayes e Markovic (2003) demonstraram que o óleo essencial obtido de *B. citriodora* apresenta um efeito tóxico sobre linhagens de células humanas (células HepG2 e F1-73 fibroblastos da pele). Destarte, existe um interesse na avaliação de segurança do uso desse óleo.



Figura 9 Aspecto geral da espécie *Backhousia citriodora*.

## 2.4 Radicais livres

O interesse pelo estudo das substâncias antioxidantes e a sua relação com os radicais livres têm se intensificado cada vez mais e tornado essencial para a compreensão de diversas patologias.

O termo radical livre é frequentemente usado para designar toda espécie química capaz de apresentar orbitais contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Essa configuração confere a esses radicais uma grande capacidade de reagir com moléculas-alvo e os tornam altamente instáveis, com meia-vida curta (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os radicais livres são produzidos constantemente e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, exercendo funções biológicas relevantes no metabolismo (BARBOSA et al., 2010).

O elétron livre que caracteriza o radical pode estar centrado em diferentes átomos: hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), carbono (C), enxofre (S) ou átomos de metais de transição (Fe,Cu). As espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do inglês reactive oxygen species), referem-se aos radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), o radical peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

No metabolismo normal dos mamíferos, o oxigênio obtido por meio da respiração chega às células, especificamente às mitocôndrias, e participa das reações de oxirredução, formando uma molécula de água, ao se combinar com os dois prótons  $H^+$ . Porém, uma pequena parte do oxigênio consumido pela mitocôndria sofre redução univalente, produzindo o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (NELSON; COX, 2014).

O superóxido sofre dismutação espontânea, reação catalisada pela superóxido dismutase, produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual reage com  $Fe^{2+}$  ou outros metais, formando o radical hidroxil, pela reação Fenton (Figura 10B). Embora o cobre possa também catalisar a reação, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais “apto” para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas. O superóxido reduz ferro (III), formando ferro (II) e promove a geração de radicais hidroxil. Esse conjunto de reações, envolvendo  $H_2O_2$ , superóxido e ferro, é conhecido como reação Haber-Weiss (Figura 10A) (DAS; WATI; FÁTIMA-SHAD, 2015).

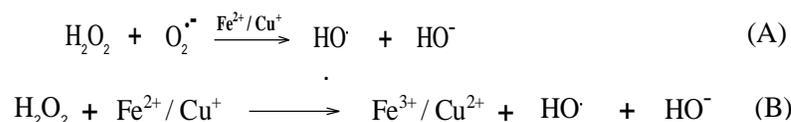
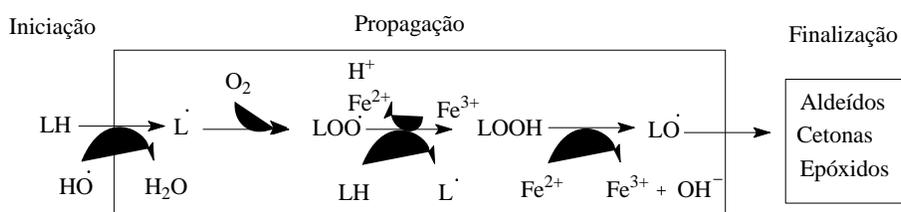


Figura 10 Reação de Haber-Weiss (A) e reação de Fenton (cobre ou ferro) (B).

O radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) é o de maior reatividade entre as espécies de oxigênio, devido ao fato de não haver enzima que catalise sua remoção. Por ser extremamente instável, ele reage rapidamente com DNA, RNA, proteínas, lipídeos e membranas celulares do núcleo e mitocondrial, danificando o alvo mais próximo do local onde foi gerado, formando outras espécies de reatividade variada (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A peroxidação de tecidos lipídicos pode romper as membranas, interrompendo os mecanismos de troca de metabólitos, podendo causar até a morte celular. A lipoperoxidação ocorre em três etapas: iniciação, propagação e finalização, conforme mostrado na Figura 11. As duplas ligações presentes entre alguns átomos de carbono dos ácidos graxos insaturados constituem ligações vulneráveis ao ataque dos radicais livres derivados do oxigênio, particularmente pela  $\text{OH}^\bullet$ . As interações lipídeo-radical liberam peróxidos que são em si espécies reativas, iniciando a subsequente redução de outro ácido graxo. Ocorre uma série de reações autocatalíticas, resultando em um extenso dano à membrana citoplasmática e às organelas (LIMA; ABDALLA, 2001; OLSZEWER, 2008).



Legenda:  $\text{L}^\bullet$  = radical lipídico;  $\text{LOO}^\bullet$  = radical peróxido.

Figura 11 Esquema geral do processo de peroxidação lipídica.  
Fonte: Santos et al. (2007).

De um modo geral, a formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fontes endógenas) e pela exposição a fatores

exógenos, como radiações gama e ultravioleta, dieta, cigarro, medicamentos, entre outros (SMITH; MARKS; LIEBERMAM, 2007).

O estresse redox é definido como um desequilíbrio dinâmico entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo. Durante esse processo, há formação de compostos potencialmente tóxicos, que causam danos à saúde, aumentando o risco de doenças como isquemia, trauma encefálico, artrite, arterosclerose, doença de Parkinson, Alzheimer, diabetes, envelhecimento, câncer, entre outras (OLIVEIRA et al., 2009).

Contudo, para auxiliar o organismo a combater o excesso de radicais livres, é necessária a ingestão de substâncias com propriedades antioxidantes.

#### **2.4.1 Compostos naturais com potencial antioxidante**

Os antioxidantes são compostos químicos que atuam em diferentes níveis na proteção do organismo, sendo capazes de interceptar os radicais livres e evitar a formação de lesões e a perda da integridade celular (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os compostos antioxidantes também são utilizados em alimentos gordurosos para retardar a sua oxidação, a qual pode alterar as suas características físicas e químicas, promovendo o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis. A oxidação desses alimentos, além de torná-los impróprios para o consumo, podem provocar alterações que modificam não só a qualidade nutricional, mas também podem produzir compostos tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes sintéticos BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno), BHA (butil-hidroxi-anisol), GP (galato de propila) e TBHQ (tert-butil-hidroquinona) são os mais utilizados na indústria de alimentos; entretanto, estudos toxicológicos têm demonstrado o potencial carcinogênico desses

compostos em experimentos com animais (RAMALHO; JORGE, 2006).

Devido à necessidade de proteção contra os radicais livres gerados pela exposição aos raios solares e ao oxigênio, as plantas concentram uma grande diversidade de antioxidantes, podendo ser consideradas fontes de novos compostos que apresentem essa atividade (SILVA, 2015).

Nesse contexto, nota-se que os produtos naturais, em especial os óleos essenciais, são cada vez mais estudados como agentes antioxidantes, na tentativa de promover a substituição dos sintéticos ou fazer associações entre eles, propiciando o desenvolvimento de técnicas que reduzam os efeitos negativos dessas substâncias consideradas maléficas à saúde.

Guimarães et al. (2011) avaliaram a capacidade antioxidante do óleo essencial de capim-limão e do seu componente majoritário, citral, utilizando os métodos de redução do radical livre DPPH e o ensaio de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Tanto o óleo essencial quanto o padrão citral apresentaram pequena atividade antioxidante perante a primeira metodologia; no entanto, no ensaio de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, esses compostos apresentaram atividades antioxidantes significativas.

Andrade et al. (2013) estudaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* e *Siparuna guianensis* por meio dos testes DPPH e oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Esses autores observaram somente atividade antioxidante perante a última técnica.

Miranda et al. (2014b) avaliaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de tomilho, capim-limão, alfavaca e manjericão, bem como dos compostos timol, citral, eugenol e linalol, utilizando as metodologias do sequestro dos radicais DPPH e da inibição da oxidação do sistema do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Por meio da análise de agrupamentos hierárquicos, os autores verificaram que os óleos essenciais e seus respectivos padrões se

agrupam em relação ao potencial antioxidante, devido à similaridade quanto aos conteúdos de fenilpropanoides e monoterpenos.

#### **2.4.2 Métodos de análise da atividade antioxidante *in vitro***

Existem diversos métodos, e não apenas um método universal, que avaliem satisfatoriamente a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, devido aos diferentes tipos de radicais livres gerados e às suas distintas formas de atuação nos organismos vivos. Assim, tem sido desenvolvido um grande número de testes, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; ALVES et al., 2010).

Esses testes podem auxiliar os pesquisadores na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais, entre outros e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos e bebidas (ALVES et al., 2010).

##### **2.4.2.1 ABTS**

O método ABTS é baseado na neutralização do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) ( $ABTS^{\cdot+}$ ) por um antioxidante. Esse radical pode ser gerado por meio de uma reação química utilizando dióxido de manganês, AAPH (2,2'-azobis amidinopropano dihidroclorídrico) ou persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), por reação eletroquímica ou enzimática (metamioglobina e peroxidase). Na presença de antioxidantes, pode-se medir a diminuição da formação desse radical, de cor verde-escura, por espectrofotometria, sendo

convertido em uma forma não colorida ou verde mais claro (Figura 12) (MAGALHÃES et al., 2008).

Os resultados podem ser expressos como equivalentes a uma solução de TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), por meio da construção de uma curva analítica com concentrações conhecidas de TROLOX. O valor da absorvância é proporcional à concentração do radical catiônico  $ABTS^{++}$  remanescente e é medida após um tempo de reação fixado, determinando, assim, a porcentagem de inibição do radical por um composto puro, extrato ou óleo essencial (MAGALHÃES et al., 2008).

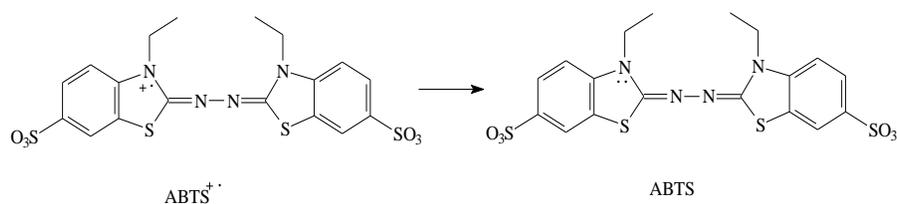


Figura 12 Estabilização do radical  $ABTS^{++}$  por um antioxidante.

#### 2.4.2.2 Metodologia que avalia a proteção do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O método avalia a capacidade de um determinado composto em prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno. É um ensaio baseado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno causada pelo ataque dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico por espécies reativas de oxigênio presentes no meio. As substâncias antioxidantes têm a função em retardar a oxidação do  $\beta$ -caroteno, protegendo-o; entretanto, na ausência dessas substâncias no meio reacional, os radicais livres formados pela perda de um próton de um grupo metileno dialílico do ácido linoleico atacam as insaturações da molécula de  $\beta$ -caroteno. Com isso, o composto perde seu cromóforo, resultando na perda da cor laranja, característica da solução, que é

monitorada espectrofotometricamente entre 450-470 nm (Figura 13) (JAYAPRAKASHA et al., 2007).

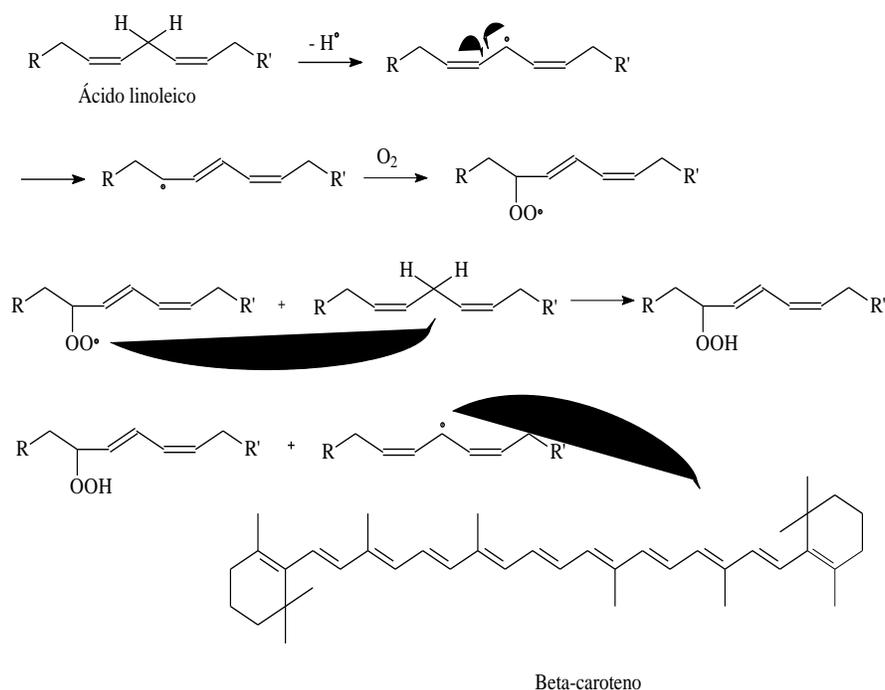


Figura 13 Reação de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

No entanto, podem ocorrer possíveis inconvenientes na realização desse método; substâncias oxidantes ou redutoras podem interferir neste ensaio. Além disto, a co-oxidação do  $\beta$ -caroteno é normalmente efetuada em um meio emulsionado, o que pode causar falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos, acrescendo, ainda, a variação que pode ocorrer devido à reação do  $\beta$ -caroteno com o oxigênio presente no meio (ALVES et al., 2010).

### 2.4.2.3 DPPH

O ensaio que avalia a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é um método muito utilizado por ser um recurso fácil e preciso para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. A estabilidade do radical ocorre devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, conferindo a ela, uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol ou metanol em cerca de 520 nm (ALVES et al., 2010). Nesse método, o radical cromógeno é reduzido por compostos antioxidantes para a correspondente hidrazina de cor amarela (Figura 14) e esse grau de descoloração é medido espectrofotometricamente por um tempo determinado ou até permanecer constante (MAGALHÃES et al., 2008).

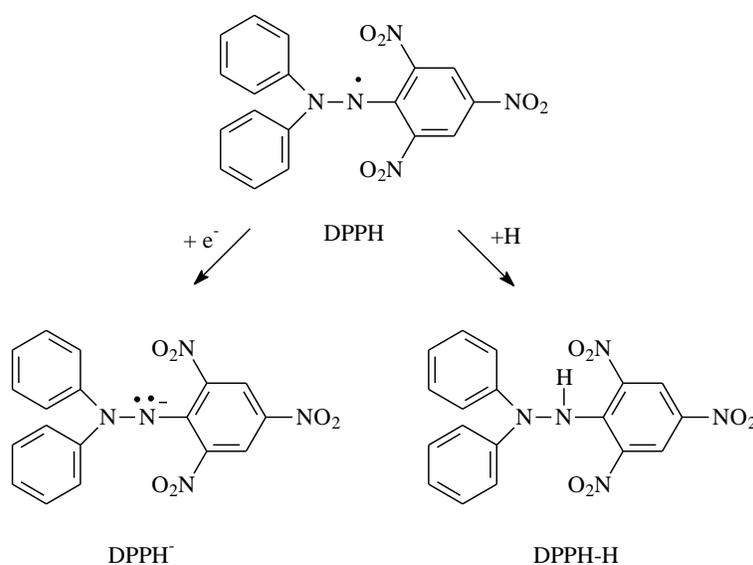


Figura 14 Estabilização do radical DPPH por um antioxidante.

Sugere-se que a determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical livre DPPH. Inicialmente, a transferência do elétron ocorre rapidamente, e a subsequente transferência de hidrogênio ocorre mais lentamente e depende da ligação de hidrogênio com o solvente. Ao utilizar solventes como metanol e etanol, compostos que apresentam interações do tipo ligação de hidrogênio, a reação de abstração do hidrogênio ocorre lentamente. De modo semelhante, os ácidos ou as bases presentes nos solventes podem influenciar o equilíbrio de ionização dos fenóis. Assim, supõem-se que esses aspectos afetem a reação que envolve a transferência de elétrons ou transferência de átomo de hidrogênio (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2004).

#### 2.4.2.4 Fosfomolibdênio

O método da complexação pelo fosfomolibdênio foi descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) e constitui uma forma simples para avaliar a capacidade antioxidante de uma mistura complexa de compostos, como é o caso dos óleos essenciais.

O ensaio baseia-se na determinação espectrofotométrica da redução do molibdênio (+6) para o molibdênio (+5), em meio ácido, com a formação subsequente de um complexo, com absorção máxima em 695 nm (Figura 15). A solução teste inicial possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz. Esse método possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

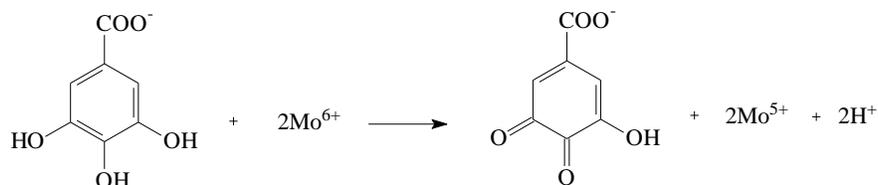


Figura 15 Reação de redução do molibdênio por um composto antioxidante.

#### 2.4.2.5 TBARS

O método TBARS trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, resultantes da oxidação de um substrato lipídico com a adição de um íon metálico de transição ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  ou uma fonte de radical livre, como o AAPH) (NOGUEIRA NETO; SOUSA; FREITAS, 2013). O malonaldeído (MA), um aldeído com três átomos de carbono, é um dos principais produtos formados pela decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados. Nesse ensaio, uma molécula de MA reage com 2 moléculas de TBA, formando um complexo de cor vermelho/violeta (TBARS), que é medido espectrofotometricamente com uma absorvância máxima a 532-535 nm (Figura 16). No entanto, o ácido tiobarbitúrico pode reagir com diferentes compostos carbonílicos, os quais são chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

A reação ocorre em meio ácido (pH 1,0-2,0) e elevada temperatura ( $100^\circ\text{C}$ ) para aumentar a sua velocidade e sensibilidade. A adição de um antioxidante inibe a oxidação dos ácidos graxos; dessa forma, a formação do MA é reduzida.

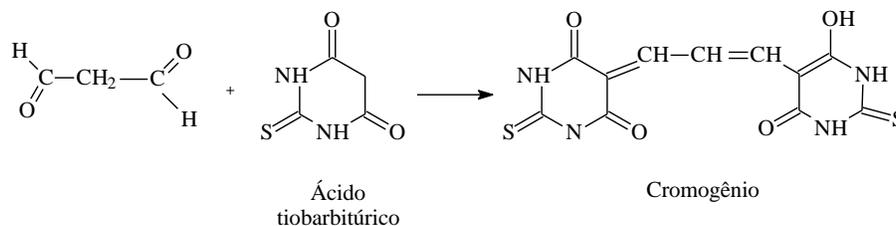


Figura 16 Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico.

#### 2.4.2.6 Radical Hidroxil

A atividade antioxidante pelo método do radical hidroxil avalia, da mesma forma que o teste TBARS, a capacidade de formação de um cromógeno por meio da formação do composto malonaldeído. Existem diversos testes para avaliar a capacidade de captar os radicais hidroxilas, mas o método utilizando o composto 2-desoxirribose é um dos mais utilizados. A reação que antecede a formação do malonaldeído é a reação de Fenton, que é uma reação em cadeia entre íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), em meio ácido, formando, assim, o radical hidroxil (Figura 17) (BAJPAI et al., 2013).



Figura 17 Reação de Fenton.

Os radicais hidroxilas que não são capturados por nenhum dos reagentes atacam o açúcar 2-desoxirribose, degradando-o em diversos fragmentos que são capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, após o aquecimento e em pH ácido, originando um pigmento rosa susceptível de ser quantificado por espectrofotometria. As substâncias que possuem propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração (ALVES et al., 2010).

## 2.5 Câncer

O câncer é uma doença multifatorial que se desenvolve em função de anormalidades celulares associadas a alterações na expressão de proto-oncogene ou gene supressor de tumor. Constitui um problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que, em 2030, serão 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, INCA, 2014; MAURO et al., 2014).

A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados a diversos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos. Sugere-se que o estresse oxidativo, inflamação crônica e câncer estejam relacionados. Diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon, apresentam níveis elevados de EROs, que regulam vias de transdução de sinais, participando das etapas da transformação e progressão tumoral (REUTER et al., 2010).

Além disso, acredita-se que diversos agentes carcinogênicos biológicos (vírus, bactérias) atuem como promotores da proliferação celular. Em uma revisão realizada por Nakagawa, Schirmer e Barbieri (2010), cita-se a identificação do DNA do vírus HPV em amostras de tecidos de carcinomas cervicais, sugerindo que a infecção pelo vírus desencadeia o desenvolvimento do carcinoma invasivo. A bactéria *Helicobacter pylori* tem sido relacionada ao linfoma gástrico e também ao adenocarcinoma, embora existam controvérsias (LEME; BOVE; SILVA, 2003).

A energia solar ionizante constitui um importante carcinógeno físico, uma vez que é capaz de induzir mutações. As radiações ultravioletas que atingem a superfície terrestre são responsáveis pelo surgimento de cânceres cutâneos, que atingem muitos indivíduos (ARAÚJO, SOUZA, 2008).

Embora a herança genética seja relevante na predisposição ao câncer, muitos casos da doença estão intimamente relacionados aos hábitos de vida inadequados, como sedentarismo, má alimentação, cigarro, ingestão de bebidas alcoólicas, entre outros (PRADO, 2014).

A formação e o desenvolvimento do câncer é um processo que consiste em várias etapas: envolve a mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. Inicia-se com uma desregulação genômica, ocasionada por um agente carcinogênico ou oncoincidiador, que provoca modificações em alguns genes e transforma a fisiologia celular. Ao longo de sua progressão, o câncer pode se tornar mais agressivo e maligno, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Considerando o ciclo celular como sendo de fundamental importância no processo de carcinogênese, algumas considerações devem ser feitas. A célula normal segue uma sequência de eventos; o ciclo celular é dividido em quatro fases: G1, S, G2 e M (Figura 18). No período S, ocorre a duplicação ou síntese do DNA. As fases G1 e G2 correspondem aos períodos em que as células se preparam para execução das fases S e M, respectivamente. No início da fase G1, em resposta aos sinais externos, as células continuam no ciclo ou entram em estado de quiescência conhecido como G0. Durante esse ciclo, existem alguns eventos importantes, como a diferenciação celular, o balanço entre os genes de controle e fatores de crescimento e oncogenes e a apoptose. Entretanto, esses eventos não ocorrem com a célula cancerosa; as células não se diferenciam e ocorre um aumento dos fatores de crescimento e oncogenes comparados ao

controle, além do fato das células com defeito não entrarem em apoptose (DE ROBERTIS; HIB, 2014; MESQUITA, 2009).

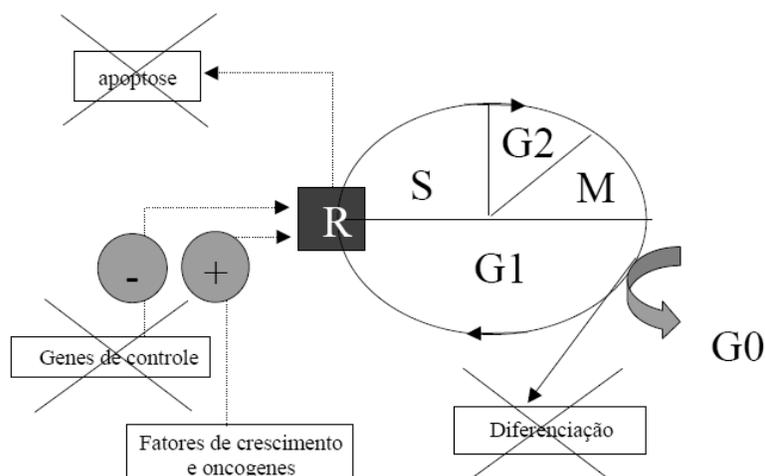


Figura 18 Esquema do ciclo celular de uma célula cancerosa.  
Fonte: De Robertis e Hib (2014); Mesquita (2009).

A maioria das drogas antineoplásicas interfere de algum modo no ciclo celular; portanto, a compreensão do funcionamento e regulação desse processo é essencial para definição clara dos mecanismos de ação dessas substâncias (ALMEIDA et al., 2005).

Existem pontos de verificação nas fases G1 e G2 do ciclo celular que são responsáveis pelo seu prosseguimento ou parada. Esses são regulados por proteínas cinases, como as CDKs (cinases dependentes de ciclina). Quando algum tipo de anormalidade ocorre, o ciclo celular para até a completa reparação celular. Caso essa reparação não seja eficiente, a célula é encaminhada para a morte celular programada (HEMAISWARYA; DOBLE, 2006). Muitos fármacos são denominados como fármacos ciclo-celular específicos, uma vez

que ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

Em síntese, o câncer é uma das doenças que, ainda nos dias atuais, causa muitas mortes no mundo. Todavia, as pesquisas continuam no sentido de desenvolver novas substâncias equivalentes aos antitumorais já conhecidos; entretanto, espera-se que apresentem efeitos tóxicos menos agressivos que esses medicamentos.

## **2.6 Compostos antitumorais de origem vegetal**

A descoberta de medicamentos para o câncer está relacionada a pesquisas de produtos naturais, e cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem, em alguma instância, sua origem relacionada à uma fonte natural (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Um dos exemplos mais importantes é o de *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*. A partir dessa planta, foram isolados os alcaloides vimblastina e vincristina, que são de grande utilidade no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (BRANDÃO et al., 2010).

Outra descoberta importante foram os derivados da casca de *Taxus brevifolia* Nutt, que incluem o paclitaxel e o docetaxel. O primeiro é indicado principalmente para tratamento do câncer de mama e de ovário, mas também pode ser utilizado em tumores epiteliais, como o de pescoço, esôfago e pulmão. O docetaxel é um análogo semissintético do paclitaxel, e também é aprovado para o uso contra o câncer de mama e de pulmão (BRANDÃO et al., 2010).

A atual necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos, mais inovadores e que atendam a doenças mais complexas, torna importante a busca de novas opções terapêuticas.

A resistência adquirida aos medicamentos anticarcinogênicos é encontrada em grande parte dos pacientes, sendo responsável por problemas

clínicos que limitam a eficácia do tratamento. Além disso, o fato de os medicamentos antineoplásicos atuarem nas células do organismo como um todo, ou seja, nas células cancerosas e normais, provoca uma série de efeitos indesejáveis.

Com o intuito de encontrar novas substâncias de origem natural com atividade inibitória sobre diversos tipos de câncer e que possam vir a ser utilizados como medicamentos ou para complementar as terapias já existentes, alguns trabalhos vêm sendo realizados (Quadro 4).

Quadro 4 Atividade citotóxica de óleos essenciais sobre diferentes linhagens celulares.

<b>Planta</b>	<b>Linhagens/ Resultados</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
<i>Backhousia citriodora</i>	HepG2 (carcinoma hepatocelular)  (IC <sub>50</sub> : 0,008-0,014% (p/v) em 4 hs e 0,003- 0.012% (p/v) em 24 hs de exposição)	MTS	Hayes e Markovic (2002)
<i>Ferulago carduchorum</i>	T47D (tumor de mama), HepG2 (hepatocarcinoma) e HT-29 (tumor do intestino) (IC <sub>50</sub> < 2 µg mL <sup>-1</sup> )	MTT	Golfakhrabadi et al. (2015)
<i>Ridolfia segetum</i> (L.)	Macrófagos, queratinócitos e hepatócitos  (Não houve efeito nas concentrações menores que 1,25 µL mL <sup>-1</sup> )	MTT	Cabral et al. (2015)
<i>Myrtus communis</i> L.	J774-A1 (macrófago murino) (IC <sub>50</sub> : 136,72±7,2 µg mL <sup>-1</sup> )	MTT	Mahmoudvand et al. (2015)
<i>Artemisia diffusa</i>	Hela (câncer cervical) (IC <sub>50</sub> : 16,34 µg mL <sup>-1</sup> )	MTT	Taherkhani (2015)

## **2.7 Ensaios de citotoxicidade**

Diante do grande número de trabalhos científicos que apresentem diversas atividades biológicas relacionadas aos óleos essenciais e que propõem a sua utilização, especialmente em alimentos, intensifica-se a necessidade de se verificar o potencial tóxico dessas substâncias para o organismo humano.

### **2.7.1 Testes hemolíticos**

Os óleos essenciais não são isentos de propriedades tóxicas. Muitos deles são agentes fotossensibilizantes; como exemplo, citam-se aqueles obtidos de frutos cítricos, que possuem furanocumarinas em sua composição. Os óleos de canela, funcho e alho, que possuem alto teor de cinamaldeído, podem ocasionar reação alérgica. Os óleos ricos em tujona (ex: sálvia), fenchona (ex: funcho), cânfora e pinocanfona (ex: manjeriço) são neurotóxicos em altas doses, podendo provocar convulsões, distúrbios sensoriais e psíquicos. O óleo essencial de noz-moscada também pode produzir excitação, alucinações visuais e distorções de cores, possivelmente devido à presença de miristicina e elemicina (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Os testes de citotoxicidade são ensaios essenciais para averiguar o risco dessas substâncias para os seres humanos (ROGERO et al., 2003). Um dos modelos experimentais utilizados para avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos químicos é o ensaio de hemólise com eritrócitos de animais e humanos. O teste de hemólise é recomendado pela Organização Mundial de Saúde, além de ser requisito nos testes toxicológicos prescritos no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2003).

A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária constitui um bom indicador de danos provocados por vários compostos como triagem de citotoxicidade. Os eritrócitos humanos, também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são células anucleadas constituídas basicamente de globulina e hemoglobina. As células eritrocitárias são fáceis de ser obtidas e isoladas, por punção intravenosa e posterior centrifugação. O monitoramento da integridade dos eritrócitos pode ser feito com relativa facilidade, detectando-se fotometricamente a hemoglobina liberada em solução (MALHEIROS; MEIRELLES; DE PAULA, 2000). Ressalta-se que a determinação das doses adequadas em teste é fundamental para não alterar as condições do meio reacional (concentração de íons, pH, hidrofobicidade, entre outros).

Nos testes que avaliam a atividade hemolítica de alguns compostos (meio sólido), utilizam-se como controle positivo peçonhas de serpentes, uma vez que elas contêm uma grande quantidade de proteínas com atividade enzimática capazes de atuar nos processos fisiológicos do organismo humano, inclusive por meio da indução de hemólise. A peçonha de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), por exemplo, apresenta como principal componente tóxico a crotoxina, uma  $\beta$ -neurotoxina heterodimérica formada pela associação não covalente de duas subunidades: a fosfolipase A<sub>2</sub> e a crotapotina. A fosfolipase A<sub>2</sub> pode agir sinergicamente com outras toxinas, promovendo a lise de eritrócitos (AIRD, 2002).

Pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar a atividade hemolítica de óleos essenciais provenientes de diferentes espécies vegetais. Yamaguchi et al. (2013) utilizaram o teste de hemólise *in vitro* utilizando uma suspensão de eritrócitos de camundongos (2%), para a avaliação do efeito do óleo essencial obtido das folhas e galhos de *Endlicheria citriodora*. As concentrações

estudadas variaram entre 1,22 - 625  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nas quais não foi observada hemólise, demonstrando que os óleos possuem baixa toxicidade.

Já Tariku et al. (2010), pesquisando o potencial hemolítico dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Artemisia abyssinica* e de *Satureja punctata* ssp, observaram danos aos eritrócitos, com 50% de lise nas diluições de 0,35  $\mu\text{L L}^{-1}$  e 1,52  $\mu\text{L L}^{-1}$ , respectivamente. Esse fato pode ser explicado em decorrência da lipofilicidade dos constituintes químicos dos óleos essenciais, que podem reagir com as partes lipídicas das membranas celulares, tornando-as mais permeáveis, culminando, assim, na lise celular (BAKKALI et al., 2008).

### 2.7.2 Métodos colorimétricos

Além dos testes hemolíticos, outros ensaios de citotoxicidade são aplicados como forma de pré-seleção para avaliar a segurança de determinadas substâncias para o consumo humano.

Com o aprimoramento das culturas celulares, foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de linhagens celulares oriundas de tumores humanos e murinos. Atualmente, são utilizadas diversas linhagens, como a SKBr3 (adenocarcinoma de mama), Jurkat (leucemia linfoblástica T), HepG2 (hepatocarcinoma), T47D (tumor de mama), HT-29 (tumor de intestino), J774-A1 (macrófago murino), Hela (câncer cervical), entre outras. Além das linhagens neoplásicas utilizadas, para se verificar a seletividade da droga, utilizam-se linhagens normais: VERO e CCD-1059Sk (obtidas de fibroblastos) (KOMARASAMY; SEKARAN, 2012; ANBARLOU et al., 2015; MAHMOUDVAND et al., 2015; GOLFAKHRABADI et al., 2015; TAHERKHANI et al., 2015).

O *screening, in vitro*, sobre células tumorais de diversas linhagens, possibilita a análise de várias amostras simultaneamente; representa uma

metodologia mais simples que os ensaios *in vivo*, além de reduzir o uso de animais em experimentos (NEIDLE; THURSTON, 2005).

No Brasil, desde 1989, o Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (LOE) realiza pesquisas de prospecção de novas moléculas com potencial atividade antitumoral e testes para determinar o potencial anticâncer de moléculas extraídas de plantas, organismos marinhos e micro-organismos. As amostras são submetidas a um teste em concentração única ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para extratos,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  para frações e  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para substâncias puras), utilizando três linhagens de tumores sólidos: SF-295 (sistema nervoso central), MDA-MB-435 (melanoma) e HCT-8 (cólon) (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Os métodos colorimétricos que quantificam a proliferação celular em cultura são considerados rápidos e úteis para a avaliação de atividade antitumoral. Um dos testes mais comumente utilizados é o MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)], o qual quantifica a habilidade das células viáveis em reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazano. Os resultados são lidos espectrofotometricamente em leitor de microplacas (MOSMANN, 1983).

Semelhante ao teste com MTT, no ensaio com MTS {sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)]}, o composto é bio reduzido pelas células num produto de formazano colorido, que é solúvel no meio de cultura (Figura 19). Essa conversão é realizada pelo NADPH ou NADH produzido por enzimas desidrogenases em células metabolicamente ativas. O ensaio é realizado por adição do reagente às culturas, com incubação durante 1-4 horas e, em seguida, afere-se a absorvância a 490 nm (CORY et al., 1991).

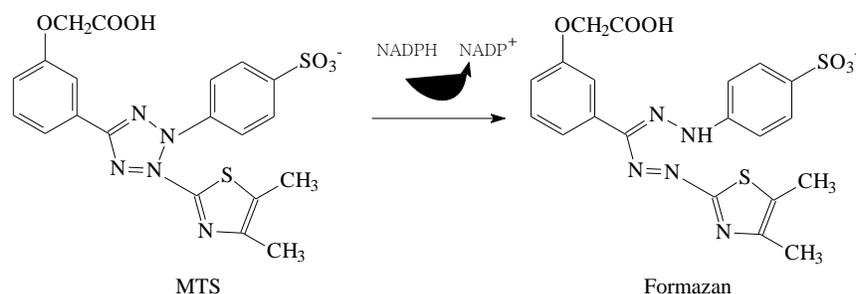


Figura 19 Estrutura do MTS e o produto formado após redução pelo metabolismo de células viáveis.

De fato, as amostras que inibem seletivamente ou indiscriminadamente a proliferação celular são selecionadas para determinação da eficácia, seletividade e mecanismo de ação do composto, em um espectro mais amplo de linhagens. Assim, os ensaios em animais podem ser realizados para comprovação da atividade antitumoral *in vivo* e de outras evidências experimentais que justifiquem seu uso (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

## 2.8 Bioensaios em vegetais superiores

Os bioensaios vegetais podem ser empregados para avaliação de efeitos tóxicos/mutagênicos de produtos naturais, uma vez que detectam danos genéticos, respondendo em nível de DNA, cromossômico e genômico (MALUSZYNSKA; JUCHIMIUK, 2005). Ademais, pode-se dizer que as plantas superiores são apontadas como ótimos modelos genéticos: possuem cromossomos grandes e numerosos, apresentam alta sensibilidade a agentes mutagênicos e permitem várias análises simultâneas, englobando desde mutações pontuais até aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos e tecidos, como pólen, raiz e folhas (LEME; MARIN MORALES, 2009).

Além dos ensaios clássicos e padrões utilizados na avaliação de toxicidade dos compostos, que incluem as análises macroscópicas (germinação e

desenvolvimento inicial da plântula) e microscópicas (índice mitótico e alterações no ciclo celular), novos métodos baseados em ferramentas moleculares e imunodeteção têm sido empregados a fim de agregar conhecimento a respeito dos mecanismos de ação de substâncias potencialmente tóxicas às células e genomas alvo (ANDRADE-VIERA et al., 2012).

A aplicação de modelos vegetais no estudo de prospecção de toxicidade de poluentes ambientais é validada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA – United States Environmental Protection Agency) (GRANT, 1994). É relevante ressaltar que os mesmos testes utilizados para detecção de mutagenicidade com poluentes ambientais podem ser usados para detectar a mutagenicidade dos produtos naturais. Entre as espécies vegetais que podem ser utilizadas nesses ensaios, a alface (*Lactuca sativa*) constitui um importante bioindicador: suas sementes são baratas, de fácil aquisição, é um material prolífico e de germinação rápida. Além disso, apresenta grande área de contato com as soluções dos compostos testados e alta sensibilidade (CAMPOS et al., 2008). A exposição ocorre no tecido meristemático de pontas de raiz, o qual é submetido a muitas divisões celulares, rápidas, aumentando, assim, a sua sensibilidade aos agentes externos (FISKESJÖ, 1985).

Andrade-Vieira, Davide e Gedraite (2010) utilizaram a espécie *L. sativa* em bioensaios citogenéticos e na germinação de sementes, a fim de avaliar os efeitos tóxicos do SPL (*spent pot liner*) e comprovaram a eficiência desse vegetal nos ensaios de toxicidade. Luber et al. (2015) também utilizaram a alface na avaliação da fitotoxicidade e citotoxicidade de três variedades de goiaba e evidenciaram os efeitos citogenotóxicos da fruta.

O uso de modelos vegetais como indicador de agentes mutagênicos possui várias vantagens: baixo custo para realização de pesquisas e apresentam boa correlação com outros modelos e sistemas-teste, como os animais. Além disso, os cromossomos de vegetais superiores são grandes e de fácil

visualização, facilitando as análises citológicas. Com os resultados dos ensaios, é possível fornecer dados que alertem a população sobre os agentes que causam câncer e mutações (GRANT, 1994), incluindo a avaliação de produtos naturais, os quais não estão isentos de toxicidade.

Aragão et al. (2015) avaliaram os efeitos citotóxicos dos óleos essenciais de *Eucalyptus grandis* e *E. citriodora* (0; 0,00625; 0,0125; 0,05; 0,1  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) sobre *L. sativa*. Foi observada redução na germinação (%), no crescimento, índice mitótico e frequência de células viáveis. Os óleos essenciais também causaram alterações nas estruturas de núcleos normais, caracterizado pela presença de núcleos condensados e aberrações cromossômicas.

Pesquisas de Ladhari, Omezzine e Haouala (2014), utilizando bioensaios para determinar, entre outros fatores, a alteração do índice mitótico e nas fases mitóticas de células da raiz de *L. sativa*, ocasionadas pela exposição ao extrato aquoso e metanólico de *Capparis spinosa* L e *Cleome arabica* L., observaram uma redução de 97,93% do índice mitótico na concentração mais alta (20 g L<sup>-1</sup>) do extrato aquoso e uma redução média de 70,75% no extrato metanólico (6 g L<sup>-1</sup>), quando comparado com o tratamento controle.

De acordo com Rank e Nielsen (1997), se um composto químico é capaz de causar danos nos cromossomos vegetais, ele tem a capacidade de ocasionar eventos mutagênicos em mamíferos. Mauro et al. (2014), avaliando a mutagenicidade e antimutagenicidade do composto inulina em um ensaio com células meristemáticas de *Allium cepa*, observaram que o composto apresenta porcentagem de redução de danos comparável à relatada em estudos nos quais se avaliaram os danos ao DNA em mamíferos.

## **2.9 Fungos do gênero *Aspergillus*: produção de micotoxinas**

Os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados anamorfos de ascomicetos pertencentes ao Reino *Fungi*, divisão *Ascomycota*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae*. São encontrados em regiões de clima quente e suportam baixa atividade de água. Podem ser utilizados em diversos processos industriais na produção de enzimas (ex: amilase) e ácidos orgânicos (ex: ácido cítrico). Além disso, alguns fármacos têm sido elaborados a partir dessas espécies. Como exemplo, cita-se a lovastatina, produzida por espécies de *A. terreus*, utilizada comercialmente no auxílio da diminuição das taxas de colesterol (ABARCA et al., 2003; KLICH, 2002).

Apesar dos aspectos econômicos positivos relacionados ao gênero *Aspergillus*, muitas espécies são produtoras de micotoxinas e estão associadas à deterioração e contaminação dos alimentos em diferentes fases, como pré e pós-colheita, processamento e manuseio. Podem colonizar uma grande variedade de *commodities* agrícolas, como café, arroz, milho, frutas, entre outros (PERRONE et al., 2007).

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos filamentosos. Apresentam propriedades tóxicas, causando problemas agudos e crônicos para a saúde humana e de animais, além do eminente risco econômico. São encontradas mais de 80 espécies micotoxigênicas, que podem produzir mais de 300 diferentes estruturas químicas, sendo algumas espécies capazes de produzir mais de um tipo de micotoxina e estar presente simultaneamente em um único produto (CARDOSO FILHO, 2012).

Alguns autores avaliaram espécies de *Aspergillus* e encontraram um elevado potencial toxigênico desse gênero em alimentos (Quadro 5).

Quadro 5 Potencial toxigênico de espécies do gênero *Aspergillus* em alimentos.

Espécies	Micotoxinas	Referências
<i>A. carbonarius</i>	Ocratoxina A	(GALLO et al., 2014)
<i>A. carneus</i>	Citrinina	(TEIXEIRA et al., 2012)
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina B1 e B2, ácido aspergílico, ácido ciclopiazônico, ácido kójico, ácido 3-nitropropiónico, paspalininas	(ZHANG et al., 2014)
<i>A. niger</i>	Ocratoxinas, malforminas, fumonisina B2	(CASTELLÁ et al., 2015; SOARES CALADO; VENÂNCIO, 2013)
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, ácido penicílico, ácido kójico, A, xantomegnina	(HARRIS; MANTLE, 2001; HUA et al., 2014)
<i>A. terreus</i>	Citrinina, patulina, citreoviridina, mevinolina, ácido terreico	(GRESSLER et al., 2011)

## 2.10 Ocratoxina A: potencial cancerígeno

A ocratoxina A (OTA) ou 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina (Figura 20) é uma micotoxina contaminante de alimentos. Foi descoberta como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus*, em 1965, durante um estudo sobre metabólitos fúngicos, o que despertou a atenção de vários pesquisadores (MERWE et al., 1965).

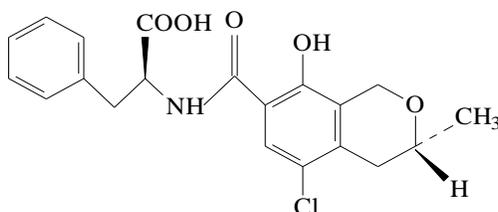


Figura 20 Estrutura química da ocratoxina A.

A OTA pode ser encontrada em diversos produtos alimentícios, incluindo nozes, amendoins secos, feijão, temperos, grãos de café e frutas secas, como também em carne processada, cereais, sementes oleaginosas, uvas, vinho, uvas passas e café (BAU et al., 2005).

Rosa et al. (2002) detectaram a presença de OTA em vinhos brasileiros. Observou-se uma contaminação de 30% em vinhos tintos, 20% em brancos e 20% em rosé. A concentração de OTA foi a mais alta para os vinhos tintos (máximo de  $0,0424 \mu\text{g L}^{-1}$ ), seguida de vinhos brancos ( $0,0354 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e de vinho rosé ( $0,0282 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Batista e Chalfoun (2007) avaliaram a incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.) (boia, mistura e varrição) após a secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. Das amostras analisadas, em 40% não foi detectada a presença de ocratoxina A e, em 31%, foram detectadas a presença de ocratoxina A em níveis que variaram de 0,1 a  $5,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de café. Foi possível observar que os níveis de contaminação foram maiores na fração varrição e nas frações boia e mistura, secas em terreiro de terra. Dessa forma, concluíram que esse ambiente aumenta o risco de contaminação com ocratoxina A em grãos de café.

Em 1993, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Câncer – IARC) avaliaram o potencial carcinogênico de micotoxinas como aflatoxina, ocratoxina, tricotecenos, zearalenona, patulina e fumonisinas e classificaram-nas em diferentes grupos (Quadro 5) (PONTES NETTO et al., 2002).

Quadro 6 Classificação de micotoxinas.

<b>Classificação</b>	<b>Micotoxinas</b>
Carcinógenos do grupo 1	Aflatoxina
Carcinógenos do grupo 2B	Fumonisina; ocratoxina
Carcinógenos do grupo 3	Tricoteceno; Zearalenona; Patulina

Grupo 1: o agente é carcinogênico em seres humanos; Grupo 2B: os agentes são possivelmente carcinogênicos; Grupo 3: os agentes não são classificados como carcinogênicos para humanos.

Fonte: Pontes Netto et al. (2002).

Verificou-se que a OTA possui propriedades nefrotóxica, teratogênica e imunotóxica, o que representa um sério risco para a saúde humana e animal. Estudos em laboratório demonstraram que essa micotoxina é capaz de causar câncer de fígado em ratos e promover o desenvolvimento de tumores no trato urinário humano (SHUNDO et al., 2006).

Testes realizados na Europa verificaram que a maioria dos europeus apresenta alguma concentração da toxina no sangue. Dessa forma, em Portugal, realizou-se um estudo sobre a ocorrência de aflatoxinas (AFB1 e AFM1) e ocratoxina A em alimentos infantis (leites em pó e farinhas à base de cereais) disponíveis no mercado para consumo. Os resultados revelaram a presença das micotoxinas em 12 amostras com teores compreendidos entre 0,017 e 0,041  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para AFM1; uma amostra com 0,009  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para AFB1 e entre 0,034 e 0,212  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para OTA (ALVITO et al., 2010).

Devido às propriedades maléficas da OTA, vários países têm elaborado legislações que permitem a concentração máxima dessa toxina em produtos agrícolas e derivados. Esses limites têm por finalidade assegurar a integridade da saúde da população, protegendo os consumidores dos riscos de ingestão da OTA. De acordo com Duarte, Lino e Pena (2010), 77 países definiram regulamentos, ao passo que 13 não apresentam nenhuma legislação específica.

No Brasil, o limite máximo permitido para micotoxinas em alimentos e

bebidas foi recentemente estabelecido; para vinhos, é de 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ANVISA, 2011).

Além dessas medidas, vêm sendo realizados alguns trabalhos nos quais se utilizam os óleos essenciais no controle de fungos e da produção de micotoxinas. Jeršek et al. (2014) estudaram os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.), abeto (*Abies alba* Mill.) e suas substâncias ativas: timol, carvacrol, mentol e anisaldeído quanto à atividade antifúngica sobre *Penicillium verrucosum* e o efeito na produção de ocratoxina A. Os resultados indicaram a possibilidade de uso do óleo essencial de orégano como substituto aos conservantes artificiais.

Hua et al. (2014) avaliaram o efeito de óleos essenciais e de alguns compostos sobre o crescimento de *Aspergillus ochraceus* e na produção de OTA, concluindo que os compostos cinamaldeído, citral e eugenol podem ser utilizados no biocontrole da contaminação por OTA em grãos de armazenamento.

## REFERÊNCIAS

ABARCA, L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 504-506, Mar. 2003.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 6, p. 407-426, Sept. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2. ed. Brasília, 2003. p. 10-16.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, Elmsford, v. 40, n. 4, p. 335-393, Apr. 2002.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p.143-152, Apr. 2013.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, jan./fev. 2005.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVITO, P. C. et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 22-30, Mar. 2010.

ANBARLOU, A. et al. Cancer stem cells in acute lymphoblastic leukemia. **Stem Cell & Translational Investigation**, Houston, TX, v. 2, e783, p. 1-2, 2015.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in *spent pot Liner* on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, n. 73, p. 626-631, Jan. 2010.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Basel, v. 2, n. 4, p. 384-397, 2013.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Toxicidade de agrotóxicos: uma abordagem citogenética e molecular. In: PRATISSOLI, D. et al. (Org.). **Tópicos especiais em produção vegetal III**. 1. ed. Porto Alegre: UFES, 2012. v. 3, p. 3979.

ARAGÃO et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, New York, v. 35, n. 1, p. 259-272, Oct. 2015.

ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 4, n. 11, p. 1-7, 2008.

BAJPAI, V. K. et al. Antioxidant capacity and phenolic content of essential oil obtained by microwave-assisted hydrodistillation from sawdust of *Chamaecyparis obtusa*. **Food Technology and Biotechnology**, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 360–369, 2013.

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

BALDWIN, I. T. Plant volatiles. **Current Biology**, London, v. 20, n. 24, p. 392-397, Dec. 2010.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul./ago. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.

BATISTA, L. B.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ocratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p.125-130, Feb. 2005.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BLANK, A. F. et al. Comportamento fenotípico e genotípico de populações de manjeriço. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 28, n. 3, p. 305-310, jul./set. 2010.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo**: patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1472 p.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal do Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS)**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 10 maio 2015.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 229-239, jul. 2010.

BROPHY, J. J. et al. Leaf oils of the genus *Backhousia* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 237-254, 1995.

CABRAL, C. et al. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 65, p. 56-61, Mar. 2015.

CAMPOS, J. M. S. et al. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**, New York, v. 22, p. 143-152, 2008.

CARDOSO FILHO, F. C. **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil**. 2012. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2012.

CASTELLÁ, G. et al. Real time quantitative expression study of a polyketide synthase gene related to ochratoxin a biosynthesis in *Aspergillus niger*. **Food Control**, Guildford, v. 53, p. 147-150, July 2015.

CASTRO, C. et al. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 241-249, mar./abr. 2005.

CERQUEIRA, M. D. et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, New York, v. 3, n. 7, p. 207-212, July 1991.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/Vania/Documents/Downloads/65-1282-5-PB.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

DAS, K. T.; WATI, M. R.; FATIMA-SHAD, K. Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. **Archives of Neuroscience**, Tehran, Iran, v. 2, n. 2, p. 1-8, Apr. 2015.

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Biologia celular e molecular**. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 363 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3<sup>rd</sup> ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 27, n. 10, p. 1440-1450, Oct. 2010.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Plantas aromáticas e medicinais. Fatores que afectam a produção. In: FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. (Ed.). **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. Lisboa: Universidade de Lisboa/Faculdade de Ciências/Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. p. 1-18. (Curso Teórico-Prático, 3).

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 69, n. 7, p. 2309–2314, Feb. 2004.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernae montana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 627-641, out. 2008.

GALLO, A. et al. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n. 179, p. 10-17, June 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar. 2007.

GOLFAKHRABADI, F. et al. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, Tehran, Iran, v. 9, n. 1, p. 104-115, June 2015.

GOMES, M. S. et al. Use of essential oils of the genus *citrus* as biocidal agents. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 5, p. 3, 299-305, Feb. 2014.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, Oct. 1994.

GRESSLER, M. et al. Multifactorial induction of an orphan PKS-NRPS gene cluster in *Aspergillus terreus*. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 18, n. 2, p.198–209, Feb. 2011.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKE, C. **PDR® for herbal medicines**. 2<sup>nd</sup>. ed. Montvale, NJ: Medical Economics Company, 2000. 858 p.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, Apr./June 2011.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, New York, v. 58, n. 5, p. 709–716, July 2001.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 4, p.535-543. Apr. 2002.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 1409–1416, Oct. 2003.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential synergism of natural products in the tratamento of câncer. **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 4, p. 239-249, Apr. 2006.

HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **Plos One**, Bethesda, v. 9, p. 1-10, Sept. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa. **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. 124 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/FDIS 4730 - Final draft, International Standard Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree Oil), Geneva, 2004.

IRELAND, B. F. et al. Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake **Biochemical Systematics and Ecology**, Philadelphia, v. 30, n. 5, p. 457–470, May 2002.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 330-336, May 2007.

JERŠEK, B. et al. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, YU, v. 65, n. 2, p. 199-208, June 2014.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

KOMARASAMY, T. V.; SEKARAN, S. D. The anti-proliferative effects of a palm oil-derived product and its mode of actions in human malignant melanoma MeWo cells. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 61, n. 4, p. 227-239, 2012.

LADHARI, A.; OMEZZINE, F.; HAOUALA, R. The impact of Tunisian Capparidaceae species on cytological, physiological and biochemical mechanisms in lettuce. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 93, p. 222–230, July 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Phytochemistry**, New York, v. 682, n. 1, p. 71-81, July/Aug. 2009.

LEME, P. L. S.; BOVE, C. R.; SILVA, R. A. *Helicobacter pylori* e câncer gástrico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 49, n. 3, p. 226-226, jul./set. 2003.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez. 2001.

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil**: madeireiras ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2003. 173 p.

LUBER, J. et al. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Lactuca sativa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 903-913, abr./jun. 2015.

LÜCKER, J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants**. Proefschrift: Wageningen University, 2002.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, n. 1, p. 1-19, Apr. 2008.

MAHMOUDVAND, H. et al. Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. **Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 53, n. 1, p. 21-27, Feb. 2015.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysics Chemistry**, Philadelphia, v. 83, n. 2, p. 89-100, Jan. 2000.

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Plant Genotoxicity**, Zagreb, Croatia, v. 56, n. 2, p. 177-184, June 2005.

MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 4808-4819, Feb. 2014.

MESQUITA, M. L. **Potencial antitumoral de substância isoladas de plantas do cerrado brasileiro**: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica. 2009. 223 p. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Chemical composition and allelopathic activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* weeds essential oils. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, 2014a.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2014b.

MONTEIRO, M. H. D. A. et al. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de *Melaleuca* L. (Myrtaceae Juss.). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 19-32, 2013.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

NAKAGAWA, J. T. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 63, n. 2, p. 307-311, mar./abr. 2010.

NEIDLE, S.; THURSTON, D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 5, p. 285-296, Apr. 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NOGUEIRA NETO, J. D. N.; SOUSA, D. P.de; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLSZEWER, E. **Clínica ortomolecular**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2008. 544 p.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: USP/ESALQ, 2004. p. 1-10.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.

PONTES NETTO, D. et al. Micotoxinas em alimentação animal no período de maio/1997 a março/2001 no Laboratório de Toxicologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina – Londrina – PR. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 63-69, jan./jun. 2002.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337–341, May 1999.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-Nnitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, n. 1-2, p. 121-127, Apr. 1997.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, Dec. 2010.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materiais Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, June 2003.

ROSA, C. A. R. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 4, p. 408-414, Apr. 2002.

SANTIAGO, J. A. et al. Chemical characterization and application of the essential oils from *Chenopodium ambrosioides* and *Philodendron bipinnatifidum* in the control of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 5, n. 26, p. 3994-4002, Dec. 2014.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604-610, maio/jun. 2007.

SILVA, J. N. **Atividade antioxidante e citotóxica de extratos de plantas do semiárido brasileiro com potencial para desenvolvimento de fitoterápicos**. 2015. 167 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6<sup>th</sup> ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 533–537, out./dez. 2006.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SOARES, C.; CALADO, T.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 30, n. 1, p. 9-13, Jan. 2013.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Nova Odessa, 2005. 640 p.

TAHERKHANI, M. Chemical constituents and *in vitro* anticancer, cytotoxic, mutagenic and antimutagenic activities of *Artemisia diffusa*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, New York, v. 48, n. 11, p. 729-734, Feb. 2015.

TARIKU, Y. et al. Essential-oil composition, antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 7, n. 4, p. 1009-1018, Apr. 2010.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology & Pharmacy**, Washington, v. 6, n. 3, p. 300-311, July 2012.

MERWE, K. J. VAN der et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, London, v. 205, p. 1113, Mar. 1965.

WHEELER, G. S. Maintenance of a narrow host range by *Oxyops vitiosa*; a biological control agent of *Melaleuca quinquenervia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Philadelphia, v. 33, n. 4, p. 365–383, Apr. 2005.

WHEELER, P. D.; PRATT, R. M.; GIBLIN-DAVIS, K. M. Intraspecific variation of *Melaleuca quinquenervia* leaf oils in its naturalized range in Florida, the Caribbean, and Hawaii. **Biochemical Systematics and Ecology**, Philadelphia, v. 35, p. 489–500, 2007.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 826-830, 2013.

ZHANG, F. et al. RNA-Seq-Based transcriptome analysis of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in response to water activity. **Toxins**, Switzerland, v. 6, n. 11, p. 3187-3207, Nov. 2014.

## **SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**

### **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte da tese estão apresentados sobre a forma de artigos, os quais serão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão dos trabalhos.

**ARTIGO 1**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE *Melaleuca alternifolia* E *Melaleuca quinquenervia*: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro***

## RESUMO

Atualmente, existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios complexos. Objetivou-se neste trabalho caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais (OEs) obtidos das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia*. A extração dos óleos essenciais foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado; a identificação e a quantificação dos constituintes foi realizada por CG/EM e CG-DIC. A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi determinada pelos métodos ABTS, DPPH, complexo fosfomolibdênio, radical hidroxil, TBARS e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Os constituintes majoritários encontrados no OE das folhas de *M. alternifolia* foram  $\gamma$ -terpineno (19,30%) e terpinen-4-ol (56,80%) e no óleo dos frutos  $\rho$ -cimeno (29,48%) e terpinen-4-ol (61,29%). O OE das folhas de *M. quinquenervia* apresentou como constituintes majoritários os compostos  $\alpha$ -pineno (61,37%) e linalol (22,08%) e, no óleo dos frutos, foram identificados esses mesmos compostos, mas em proporções distintas:  $\alpha$ -pineno (34,49%) e linalol (13,72%), acrescidos de outros componentes;  $\rho$ -cimeno (17,99%) e 1,8-cineol (11,24%). O OE das folhas de *M. alternifolia* apresentou maior atividade antioxidante perante os métodos fosfomolibdênio e hidroxil, sendo, juntamente com os demais óleos, ineficazes para os outros métodos. Isso pode ser devido a diversos fatores inerentes a cada metodologia que influenciam a atividade antioxidante.

Palavras-chave: Plantas. Myrtaceae. Radicais livres.

## ABSTRACT

Currently, there are several methods to evaluate in vitro antioxidant activity of biologically active substances, ranging from chemical assays with lipid substrates to complex trials. The aim of this work is to chemically characterize and evaluate the in vitro antioxidant activity of essential oils (EOs) obtained from the leaves and fruits of *Melaleuca alternifolia* and *Melaleuca quinquenervia*. The extraction of essential oils was performed through hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus; identification and quantification of the components was performed by GC/MS and GC-FID. The antioxidant activity of essential oils was determined by ABTS methods, DPPH, phosphomolybdenum complex, hydroxyl radical, TBARS and  $\beta$ -carotene/linoleic acid. Most constituents found in the EO from leaves of *M. alternifolia* were  $\gamma$ -terpinene (19.30%) and terpinen-4-ol (56.80%) and on the oil from the fruit  $\rho$ -cymene (29.48%) and terpinen -4-ol (61.29%). The EO from *M. quinquenervia* leaves showed as major constituents the compounds  $\alpha$ -pinene (61.37%) and linalool (22.08%). The oil of fruits presented the same compounds, but in different proportions;  $\alpha$ -pinene (34.49%) and linalool (13.72%), and also other components:  $\rho$ -cymene (17.99%) and 1,8-cineole (11.24%). The EO from *M. alternifolia* leaves showed higher antioxidant activity compared to phosphomolybdenum and hydroxyl methods, which are, along with other oils, ineffective for the other methods. This might be due to several factors inherent to each method that influence the antioxidant activity.

Keywords: Plants. Myrtaceae. Free radicals.

## 1 INTRODUÇÃO

*Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (família: Myrtaceae) é uma espécie originária da Austrália, produtora de óleo essencial, que possui propriedades medicinais e inseticidas (PINO et al., 2011). Também nativa da Austrália, a espécie *M. alternifolia*, conhecida como árvore-do-chá (Tea tree), é uma planta rica em terpinen-4-ol, um dos principais compostos responsáveis por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas, garantindo-lhe importância comercial (MONTEIRO et al., 2013). Embora sejam encontrados na literatura vários trabalhos nos quais se relatam a composição química dos óleos essenciais de folhas de *M. alternifolia*, poucos estudos químicos de outras partes desta planta, como dos frutos, são descritos.

Normalmente, as plantas são capazes de produzir antioxidantes para controlar o estresse oxidativo causado pela radiação solar e oxigênio atmosférico, entre outros fatores. De fato, a utilização desses agentes antioxidantes pode representar uma nova abordagem na inibição dos danos provocados pelo excesso de radicais livres.

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e às suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, a atividade antioxidante não deve ser medida precisa e quantitativamente com base em um único modelo de teste. Dessa forma, vários métodos são utilizados para investigar a propriedade antioxidante de amostras (dietas, extratos de plantas, antioxidantes comerciais e óleos essenciais) e têm se tornado ferramentas usuais e extremamente importantes na seleção inicial de substâncias bioativas que possam ser utilizadas como fármacos (ALVES et al., 2010).

Entre os métodos de neutralização de radicais livres, o método DPPH é rápido, simples e barato, em comparação com outros modelos de ensaio. Por outro lado, o ensaio de descoloração ABTS é aplicável em ambos antioxidantes

hidrofílicos e lipofílicos (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Assim, os objetivos neste trabalho foram caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* utilizando diferentes métodos.

### **1.1 Coleta e extração dos óleos essenciais**

As espécies *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* foram coletadas na Fazenda Guapiara, município de Aiuroca-MG. As folhas e os frutos das espécies foram selecionados e submetidos ao processo de hidrodestilação durante 2 horas, em aparelho do tipo Clevenger modificado. O hidrolato foi coletado e centrifugado a 965,36 g por 5 minutos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010). Os óleos essenciais (OEs) obtidos foram acondicionados em frascos de vidros e armazenados sob refrigeração e na ausência de luz, sendo identificados como M1FL, M1FR, M2FL e M2FR, correspondentes aos óleos das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*, respectivamente.

A identificação das espécies vegetais foi realizada pela doutora Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia da UFLA e as exsicatas foram depositadas no Herbário ESAL, sob os registros de numeração 28289 e 28290 para *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*, respectivamente.

### **1.2 Determinação da umidade e rendimento das extrações**

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL acoplado a um condensador com coletor Dean-Stark, foram colocados 5 g do material vegetal com 80 mL de ciclohexano. Após 2 horas, o volume de água foi medido

para o cálculo do rendimento das extrações em Base Livre de Umidade (%p/p BLU) (PIMENTEL et al., 2006).

### **1.3 Caracterização química dos óleos essenciais**

A avaliação qualitativa dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM - Shimadzu, modelo QP 5050A). A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de alcanos lineares ( $nC_8$ - $nC_{18}$ ), fazendo-se extrapolação para  $C_{19}$  e  $C_{20}$ . Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21 para a comparação dos dados dos espectros. Na avaliação quantitativa, utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC), sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

A análise dos componentes principais (ACP) foi utilizada na compreensão da similaridade entre os óleos essenciais com relação aos seus constituintes químicos, utilizando-se o programa Chemoface (NUNES et al., 2012).

### **1.4 Avaliação da atividade antioxidante**

Os óleos essenciais e os controles positivos BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) (métodos ABTS, DPPH,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e TBARS), ácido ascórbico (método fosfolíbdato) ou manitol (método hidroxil) (reagentes

Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ) foram avaliados nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 500 e 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

#### 1.4.1 Método ABTS

O radical é formado pela reação da solução ABTS<sup>•+</sup> 7mM com a solução de persulfato de potássio 2,45mM, incubados à temperatura de 25 °C e ao abrigo de luz, durante 12-16h (ANTUNES et al., 2010; GUERREIRO et al., 2013). Após esse período, 0,1 mL de óleo essencial foi adicionado a 1,9 mL da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. A absorvância foi monitorada espectrofotometricamente a 735 nm, durante 6 minutos (Shimadzu 160-UV). A porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação: % Efeito de captação do radical =  $[(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] * 100$ , ( $A_{CN}$  = Absorvância do controle negativo;  $A_{Am}$  = Absorvância da amostra).

#### 1.4.2 Método DPPH

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,7 mL da solução de DPPH, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição dos óleos essenciais em metanol (LOPES-LUTZ et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2011). Após 60 minutos, leituras foram realizadas a 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:  $AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$ , ( $A_{Amo}$  = Absorvância do DPPH com a amostra;  $A_{CN}$  = Absorvância do DPPH com o metanol).

#### 1.4.3 Radical hidroxil

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,05 mL da diluição de cada óleo essencial. Em seguida, 0,1 mL de um mix de solução [Fe-EDTA], 0,1 mL de 2-desoxirribose, 0,68 mL de solução de tampão monobásico de potássio 0,1 M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) e 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  113 mM foram adicionados à mistura, a qual foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Posteriormente, 0,5 mL de ácido tricloroacético e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico foram adicionados aos tubos de ensaio, que foram aquecidos em banho-maria ( $95^\circ\text{C}$ ) durante 10 min. Após resfriar até à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 532 nm (DANDLEN et al., 2010; BOULANOUAR et al., 2013). A atividade de inibição do radical  $\text{OH}\cdot$  (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação:  $I (\%) = [(A_{\text{CN}} - A_{\text{Am}}) / A_{\text{CN}}] \times 100$ , ( $A_{\text{CN}}$  = Absorbância do controle negativo;  $A_{\text{Am}}$  = Absorbância da amostra).

#### 1.4.4 Ensaio do $\beta$ -caroteno/Ácido Linoleico

Inicialmente foi preparada uma solução contendo 0,06 mL de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20, 6 mg de  $\beta$ -caroteno e 30 mL de clorofórmio. Todo o clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotatório com um banho a  $50^\circ\text{C}$  (Büchi Rotavapor R 114). Posteriormente, 150 mL de água destilada saturada com oxigênio foram acrescentados na mistura sob agitação constante. Em tubos de ensaio, 2,7 mL dessa solução foram adicionados para 0,3 mL de cada diluição dos óleos essenciais. A absorbância (470 nm) foi medida imediatamente e, após 60 minutos de incubação a  $50^\circ\text{C}$  e ao abrigo de luz (ANDRADE et al., 2013; LOPES-LUTZ et al., 2008). A atividade antioxidante (AA%) foi calculada como porcentagem de atividade após 60 min de incubação, por meio da seguinte equação:  $AA\% = [1 - (A_{\text{Am}0} - A_{\text{Am}} / A_{\text{CN}0} - A_{\text{CN}})] * 100$ , ( $A_{\text{Am}0}$  = Absorbância no início da incubação com a amostra;  $A_{\text{Am}}$  = Absorbância depois de 1 hora de incubação com a amostra;  $A_{\text{CN}0}$  = Absorbância no início da

incubação com o etanol;  $A_{CN}$  = Absorbância depois de 1 hora de incubação com o etanol).

#### 1.4.5 Método do TBARS

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de gema de ovo homogeneizada em água (10% p/v) (como fonte de lipídeos) e 0,1 mL das diluições dos óleos essenciais. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL da solução [FeSO<sub>4</sub>- EDTA] 6mM, 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,2 mL de água destilada. Posteriormente, adicionaram-se 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,8% (p/v) em dodecilsulfato de sódio 1,1% (p/v). Para o controle negativo, utilizaram-se 0,1 mL de metanol e, para o controle positivo, utilizou-se o BHT. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida por 1 h em banho-maria a 95°C. Após o resfriamento das amostras (temperatura ambiente), foram colocados 2,5 mL de butan-1-ol em cada tubo de ensaio, seguindo com a centrifugação por 10 min a 3000 g. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm (BOUNATIROU et al., 2007). Todos os valores foram expressos em porcentagem da atividade antioxidante (%AA), calculados por meio da fórmula:  $\%AA = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] \times 100$ , ( $A_{CN}$  = Absorbância do controle negativo;  $A_{Am}$  = Absorbância da amostra).

#### 1.4.6 Complexo fosfomolibdênio

Uma alíquota de 0,1 mL das soluções dos óleos essenciais diluídos em etanol foi adicionado em um tubo de ensaio com 1 mL de solução de reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, 28 mM de fosfato de sódio, molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram tampados e incubados em um banho-maria a 95°C durante 60 minutos. Após o resfriamento das amostras, realizou-se a leitura a 695 nm

(PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A capacidade antioxidante foi expressa em relação ao ácido ascórbico.

#### **1.4.7 Análises estatísticas**

Os experimentos foram submetidos à análise de variância, seguida pelo Teste F, para verificar o efeito das concentrações sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais e dos padrões. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (5 X 7), sendo cinco amostras analisadas (M1FL, M1FR, M2FL, M2FR e um padrão: BHT, manitol ou ácido ascórbico) e sete concentrações (750, 500, 250, 200, 150, 100, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com três repetições. As análises foram realizadas utilizando o programa Sisvar e, por meio do teste de média Scott Knott, as médias das atividades antioxidantes foram comparadas (FERREIRA et al., 2011).

## 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Rendimento e composição química dos óleos essenciais

Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* foram de 3,26; 0,26; 0,18 e 0,05% (p/p em Base Livre de Umidade), respectivamente. Os constituintes químicos dos óleos essenciais (Figura 1), suas porcentagens e índices de retenção estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia*.

Composto	IRcal	IRlit	M1FL	M1FR	M2FL	M2FR
Isobutil-isobutirato	904	908	-	-	0,90	3,37
$\alpha$ -Pinoeno	929	932	2,72	1,32	<b>61,37</b>	<b>34,49</b>
$\beta$ -Pinoeno	970	974	-	-	1,53	0,72
$\alpha$ -Felandreno	996	1002	-	-	1,59	-
$\alpha$ -2-Careno	1009	1001	5,47	-	-	-
$\rho$ -Cimeno	1017	1020	<b>9,84</b>	<b>29,48</b>	3,24	<b>17,99</b>
Limoneno	1021	1024	-	-	-	1,10
1,8-Cincole	1024	1026	-	-	0,05	-
1,8-Cineol	1026	1025	-	-	-	<b>11,24</b>
Linalol	1095	1092	-	-	<b>22,08</b>	<b>13,72</b>
<i>endo</i> -Fenchol	1107	1114	-	-	-	0,78
<i>exo</i> -Fenchol	1108	1118	-	-	0,46	-
6-Canfenol	1119	1111	-	-	-	1,61
<i>trans</i> -Pinocarveol	1134	1135	-	-	1,40	1,79
$\gamma$ -Terpineno	1052	1054	<b>19,30</b>	-	-	-
Pinocarvona	1158	1160	-	-	1,00	-
Borneol	1161	1165	-	-	-	0,73
Terpinen-4-ol	1177	1174	<b>56,80</b>	<b>61,29</b>	-	2,04
$\alpha$ -Terpineol	1186	1188	2,58	3,62	-	6,93
Mirtenol	1191	1194	-	-	-	0,84
Total (%)			96,71	95,71	93,62	97,35

IR cal. – Índice calculado; IR lit. – Índice de retenção da literatura; M1FL- óleo essencial das folhas de *M. alternifolia*; M1FR- óleo essencial dos frutos de *M. alternifolia*; M2FL- óleo essencial das folhas de *M. quinquenervia*; M2FR- óleo essencial dos frutos de *M. quinquenervia*.

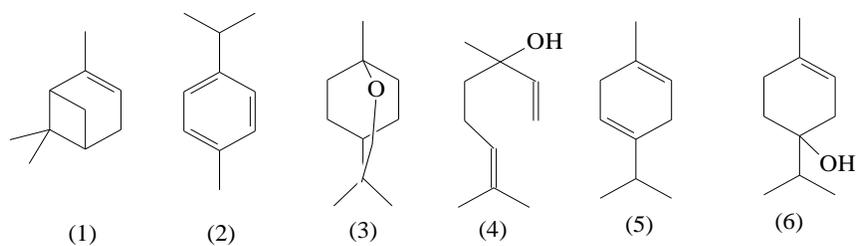


Figura 1 Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinaquenervia*. (1)  $\alpha$ -pineno; (2) p-cimeno; (3) 1,8-cineol; (4) linalol; (5)  $\gamma$ -terpineno; (6) terpinen-4-ol.

A ACP mostrou que, com a primeira, segunda e terceira componentes principais, foi possível descrever 98,89% dos dados, sendo 56,48% da variância total descrita pela primeira componente principal. Foi possível agrupar quimicamente as amostras, de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças com relação aos constituintes químicos (Figura 2).

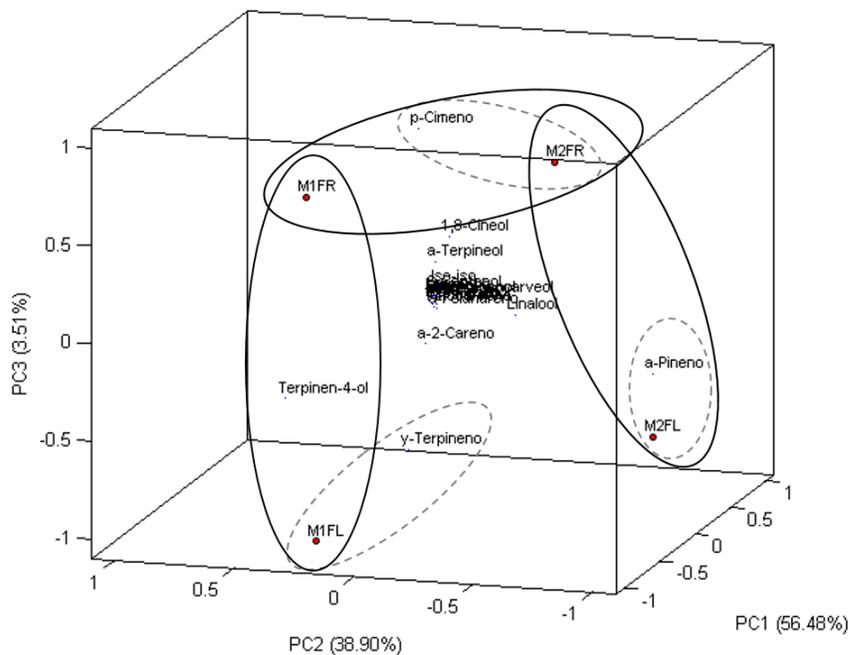


Figura 2 Gráfico biplot PC1 x PC2 X PC3 dos loadings e scores para os óleos essenciais de duas espécies do gênero *Melaleuca*, em relação aos diferentes teores dos seus constituintes químicos

Por meio da análise dos constituintes químicos apresentados na Tabela 1 e pela ACP, pôde-se verificar que os óleos essenciais M1FL e M1FR ficaram mais próximos, devido à similaridade quanto ao teor do composto terpinen-4-ol. Entretanto, observou-se que o óleo essencial M1FL foi influenciado pela presença do componente  $\gamma$ -terpineno. De forma semelhante, verificou-se que os óleos essenciais M1FR e M2FR ficaram próximos, o que está relacionado ao conteúdo do composto  $\rho$ -cimeno. Já a similaridade dos óleos essenciais M2FR e M2FL ocorre devido ao teor do constituinte  $\alpha$ -pineno.

Esses resultados estão de acordo com diversos autores, que afirmam a presença do terpinen-4-ol como componente majoritário do óleo essencial

de *M. alternifolia*. Pereira et al. (2014) identificaram 27 constituintes no óleo essencial das folhas dessa espécie coletada em Viçosa-MG/Brasil e relataram como principais compostos o terpinen-4-ol (42,8%),  $\gamma$ -terpineno (20,4%),  $\rho$ -cimeno (9,6%),  $\alpha$ -terpineno (7,9%), 1,8-cineol (3,0%),  $\alpha$ -terpineol (2,8%) e  $\alpha$ -pineno (2,4%). Já Mazzarino (2015), avaliando a composição química do óleo essencial de *M. alternifolia* proveniente de uma comuna italiana, encontrou os mesmos compostos, em proporções distintas, acrescidos de  $\alpha$ -terpinoleno,  $\beta$ -pineno, silvestreno e cadineno.

Gbenou et al. (2007), estudando a constituição química de diferentes quimiotipos da espécie *M. quinquenervia* por meio da ACP, observaram a separação dos constituintes em três grupos: grupo 1 (1,8-cineol 50,0%), grupo 2 (1,8-cineol 33,0% e viridiflorol 32,0%) e grupo 3 (viridiflorol 50,0%). Resultados similares foram observados por Philippe et al. (2002) que, analisando o óleo essencial obtido das folhas de *M. quinquenervia* coletadas na Índia, constataram a presença dos compostos 1,8-cineol (48,0%), nerolidol (9,0%) e viridiflorol (5,0%). Esses resultados diferem daqueles obtidos neste trabalho, uma vez que os compostos viridiflorol e nerolidol não foram encontrados nos óleos essenciais de *M. quinquenervia*, enquanto o composto 1,8-cineol está presente apenas no óleo extraído dos frutos.

Apesar de alguns trabalhos relatarem a composição química do óleo essencial de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*, nota-se que a maioria se refere ao óleo extraído das folhas, sendo escassos os trabalhos com os óleos obtidos dos frutos dessas espécies.

As possíveis diferenças qualitativas e quantitativas na composição química encontrada para esses óleos, comparadas a outros estudos, podem ser atribuídas a diversos fatores, como genéticos, ambientais (clima, sazonalidade, geografia) e modos de extração (AFOULOUS et al., 2013).

Com relação aos fatores genéticos, de acordo com Webb et al. (2013), a maioria dos genes da via MEP (2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato) é corregulada e os níveis de transcrição de vários genes dentro dela estão correlacionados com o rendimento do óleo essencial de *M. alternifolia*. Usando a análise de regressão múltipla, observou-se que a mudança na expressão de genes explicou 87% da variação na concentração dos monoterpenos foliares presentes na espécie.

## **2.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais**

Os valores de atividade antioxidante dos óleos essenciais das espécies de *Melaleuca* com relação às suas concentrações e avaliação por distintos métodos estão apresentadas nas Figuras 3 e 4.

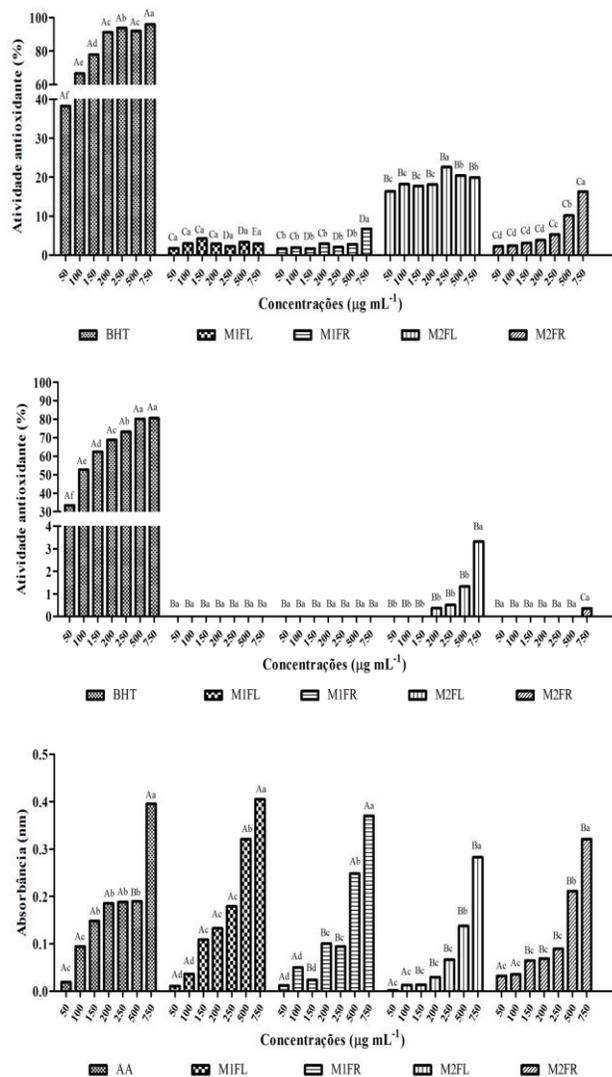


Figura 3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia* determinada por meio de diferentes ensaios: (1) ABTS; (2) DPPH; (3) Fosfomolibdênio. Médias seguidas da mesma letra (letra minúscula representa a comparação dentro de cada tratamento e maiúscula, a comparação entre as concentrações de cada tratamento) não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

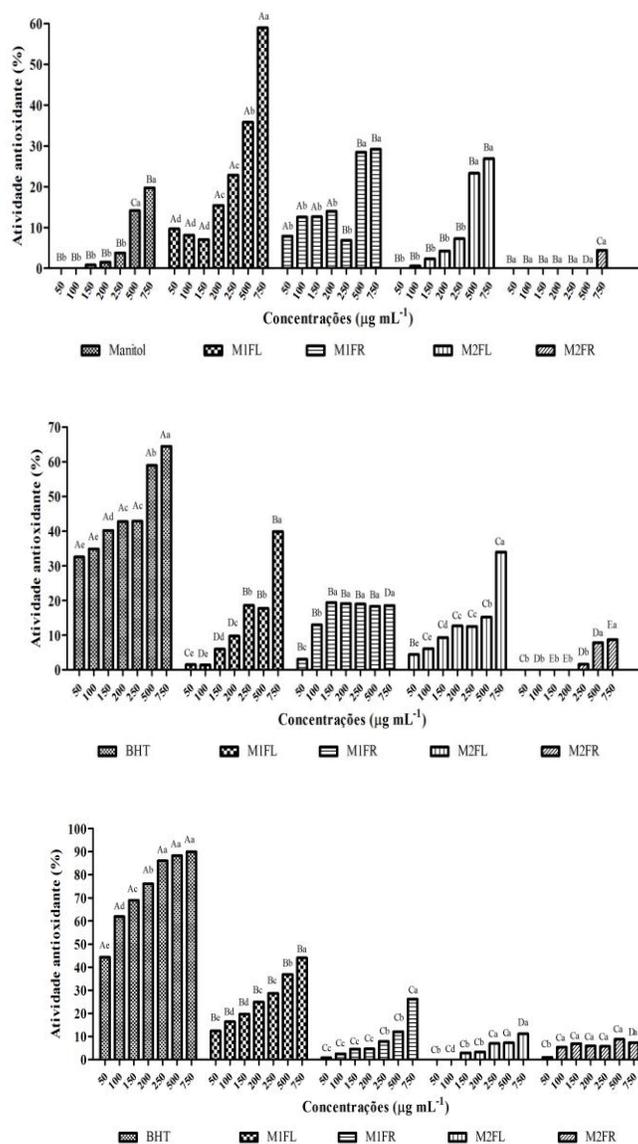


Figura 4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia* determinada por meio de diferentes ensaios: (4) Hidroxil; (5) TBARS; (6) Oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico. Médias seguidas da mesma letra (letra minúscula representa a comparação dentro de cada tratamento e maiúscula, a comparação entre as concentrações de cada tratamento) não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Comparando-se os óleos essenciais avaliados nas mesmas concentrações pelo método ABTS, nota-se que o óleo extraído das folhas de *M. quinquenervia* proporcionou uma maior atividade antioxidante, comparado aos demais (16,7-23,8%), embora todos tenham apresentado baixa atividade, inferior ao BHT (38,2-95,9%) (Figura 3). De modo geral, para o ensaio que avalia a atividade antioxidante pela redução do radical estável DPPH, os óleos essenciais não se mostraram ativos, uma vez que os compostos hidrocarbônicos apresentam maior dificuldade para doar elétrons para estabilização do radical. Esse método mostra-se mais apropriado para avaliar compostos que possuem a capacidade de doar hidrogênio, por exemplo (ANDRADE et al., 2013).

Esses efeitos podem estar relacionados à presença dos compostos majoritários  $\alpha$ -pineno e linalol, presentes em maiores concentrações no óleo essencial dessas folhas. Sarikurkcu et al. (2015), estudando a composição química e atividade antioxidante de subespécies de *Origanum vulgare* (subsp. *vulgare* e subsp. *hirtum*), constataram a presença do composto linalol (96,31%) na subespécie *hirtum* (OVH), o qual apresentou fraca atividade antioxidante pelo método ABTS e não apresentou atividade perante o método DPPH.

Os resultados demonstram que as medidas de absorvância aumentam com a concentração dos óleos perante a metodologia do fosfomolibdato. Os óleos essenciais de *M. alternifolia* apresentaram resultados superiores aos óleos de *M. quinquenervia* a partir da concentração de  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  e, ao ácido ascórbico, na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; porém, valores semelhantes obtidos para o composto referência na concentração de  $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Com relação à atividade equivalente ao ácido ascórbico, foram obtidos os valores de 0,84; 1,07; 1,43 e 1,33  $\mu\text{g}$  de AA por  $\mu\text{g}$  de OEs das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*, respectivamente.

Para o teste da porcentagem de inibição do radical hidroxil, o óleo essencial MIFL apresentou maior atividade antioxidante em comparação com os

demais óleos e com o composto manitol (Figura 4), um conhecido sequestrador de radicais hidroxila (MIR; BHAT; AHANGAR, 2014).

Utilizando-se o ensaio que avalia a atividade antioxidante por meio da inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os óleos essenciais, quando avaliados nas mesmas concentrações, apresentaram atividades antioxidantes inferiores ao antioxidante sintético BHT. Entre os óleos, o M1FL apresentou maior atividade antioxidante na concentração de 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Resultados similares foram obtidos na avaliação da atividade antioxidante pelo método da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico; os óleos essenciais também apresentaram baixa atividade em comparação ao BHT; entretanto, o óleo M1FL apresentou maior atividade que os demais (12,5–44,1%) em todas as concentrações testadas. Segundo Andrade et al. (2013), os óleos essenciais ricos em terpenos apresentam melhores valores de atividade antioxidante pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do que pelo método de DPPH, pelo fato de o primeiro método ser mais específico para antioxidantes lipofílicos.

Os resultados descritos demonstram a importância da utilização de vários métodos de avaliação da atividade antioxidante, pois os diferentes mecanismos, que são inerentes a cada metodologia, podem ser acessados pela rica variedade de compostos presentes em cada óleo essencial.

### 3 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de *M. alternifolia* foram o  $\rho$ -cimeno (9,84%),  $\gamma$ -terpineno (19,30%), terpinen-4-ol (56,80%). No óleo dos frutos, foram identificados  $\rho$ -cimeno (29,48%) e terpinen-4-ol (61,29%) como componentes principais.

O óleo essencial obtido das folhas de *M. quinquenervia* apresentou como constituintes majoritários os compostos  $\alpha$ -pineno (61,37%) e linalol (22,08%) e, no óleo dos frutos, foram identificados esses mesmos compostos, mas em proporções distintas:  $\alpha$ -pineno (34,49%) e linalol (13,72%), acrescidos de outros componentes:  $\rho$ -cimeno (17,99%) e 1,8-cineol (11,24%).

O OE das folhas de *M. alternifolia* apresentou maior atividade antioxidante perante os métodos hidroxil e fosfomolibdênio, sendo, juntamente com os demais óleos, ineficazes para os outros métodos.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AFOULOUS, S. et al. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 56, p. 352-362, June 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p.143-152, Apr. 2013.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Basel, v. 2, n. 4, p. 384-397, 2013.

ANTUNES, M.D.C. et al. Effects of posthar-vest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 58, p. 6173–6181, May 2010.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 46, p. 85-96, Apr. 2013.

BOUNATIROU, S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 1, p. 146-155, 2007.

DANDLEN, S. A. et al. Antioxidant activity of six portuguese thyme species essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 3, p. 150-155, May/June 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GBENOU, J. D. et al. Chemotypes in *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) ST Blake (Niaouli) from benin using multivariate statistical analysis of their essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 101-104, 2007.

GUERREIRO, A. C. et al. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 159, p. 96-102, July 2013.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr./jun. 2011.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

MAZZARRINO, G. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 50, p. 794-803, Apr. 2015.

MIR, S. A.; BHAT, A. S.; AHANGAR, A. A. A new Fenton assay for Hydroxyl radical scavengers by monitoring Catechol oxidation. **International Journal of PharmTech Research**, Nagpur, v. 6, n.2, p. 759-768, Apr./June 2014.

MONTEIRO, M. H. D. A. et al. óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de *Melaleuca* L. (Myrtaceae Juss.). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 19-32, 2013.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.

PEREIRA, et al. *In vitro* genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 151, n. 2, p. 852-857, Feb. 2014.

PHILIPPE, J. et al. Chemical composition of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake leaf oil from India. **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 14, n. 13, p. 181-182, 2002.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, abr. 2006.

PINO, O. et al. Composición química y actividad plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 26, n. 3, p. 77-186, sept./dic. 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

SARIKURKCUA, C. et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 70, p. 178-184, Aug. 2015.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Philadelphia, v. 11, p. 463-471, 1963.

WEBB, H. et al. The Yield of essential oils in *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) is regulated through transcript abundance of genes in the MEP pathway. **PLoS ONE**, Bethesda, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013.

**ARTIGO 2**

**ATIVIDADES ANTITUMORAL E HEMOLÍTICA DOS ÓLEOS  
ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FRUTOS DE *Melaleuca alternifolia* E  
*Melaleuca quinquenervia***

## RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial que representa uma das maiores causas de morte no mundo. A pesquisa de produtos naturais constitui uma estratégia para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos. Objetivou-se neste trabalho avaliar as atividades antitumoral e hemolítica dos óleos essenciais (OEs) obtidos das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia*. A extração dos óleos essenciais foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado. A atividade antitumoral foi determinada pelo método do MTS e avaliada sobre diferentes linhagens de células neoplásicas: adenocarcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma de mama (MCF7), carcinoma de fígado (HepG2), glioblastoma (U251-MG) e melanona (HT144). Adicionalmente, para verificação da atividade hemolítica, utilizaram-se dois métodos; em meio líquido e sólido. Os resultados mostraram redução de aproximadamente 10% e 11% na viabilidade celular em culturas HepG2 tratadas com o óleo essencial dos frutos de *M. alternifolia*, nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Para as culturas tratadas com o óleo essencial dos frutos de *M. quinquenervia*, observou-se viabilidade celular de 4% na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No entanto, não foi observada redução na viabilidade celular nas culturas submetidas ao tratamento com os óleos essenciais obtidos das folhas. Verificou-se que os óleos apresentaram efeito hemolítico perante as duas metodologias, com exceção dos óleos essenciais obtidos das folhas e frutos de *M. quinquenervia* que, ao serem avaliados em meio sólido, não promoveram a formação de halos. Os OEs apresentaram baixa atividade citotóxica frente às linhagens neoplásicas, mas apresentaram efeito citotóxico em eritrócitos.

Palavras-chave: Produtos naturais. Eritrócitos. Câncer.

## ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease that is a major cause of death worldwide. The research on natural products is a strategy for the development of anticancer agents. The aim of this study was to evaluate the antitumor and hemolytic activity of essential oils (EOs) obtained from the leaves and fruits of *Melaleuca alternifolia* and the fruits of *Melaleuca quinquenervia*. The extraction of essential oils was performed through the hydrodistillation technique using the modified Clevenger apparatus. The antitumor activity was determined by the MTS method and evaluated on different strains of neoplastic cells: the lung adenocarcinoma (A549), breast adenocarcinoma (MCF7), liver carcinoma (HepG2), glioblastoma (U251-MG), and melanoma (HT144). Additionally, to verify hemolytic activity two methods were used; in liquid medium and solid medium. The results presented a reduction of approximately 10 and 11% in HepG2 cell viability in cultures treated with the essential oil of *M. alternifolia* fruits at concentrations of 100 and 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. In crops treated with the essential oil from the fruit of *M. quinquenervia* cell viability was observed at 4%, with a concentration of 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . However, there was no reduction in cell viability in crops subjected to treatment with the essential oils obtained from leaves. It has been found that the oils show hemolytic effects in both methodologies, but the most essential oils obtained from leaves and fruits of *M. quinquenervia*, when assessed on solid media did not promote the formation of halos. The EOs showed low cytotoxic activity compared to neoplastic strains but showed cytotoxic effect on red blood cells

Keywords: Natural products. Erythrocytes. Cancer.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença ocasionada por sucessivas mutações no material genético de células, o que pode induzir a desordens nos processos normais de divisão celular e provocar um crescimento celular desordenado (REDDY, et al., 2003). Constitui um problema de saúde pública no mundo. No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2030 preveem aproximadamente 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução da mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, INCA, 2014).

A busca por agentes citotóxicos mais eficazes continua a ser um ramo importante na pesquisa de produtos naturais para a descoberta de novas drogas. Estudos recentes relatam que os óleos essenciais são considerados potenciais fontes de substâncias biologicamente ativas contra o câncer. Greay et al. (2010) demonstraram a atividade anticâncer de *M. alternifolia* sobre células de melanoma murino, ressaltando a importância de estudos sobre a espécie (GOLFAKHRABADI et al., 2015; CABRAL et al., 2015; MAHMOUDVAND et al., 2015; TAHERKHANI, 2015).

Contudo, tendo em vista as diversas atividades biológicas dos óleos essenciais, são necessários, entre outros estudos, aqueles que se relacionem aos aspectos toxicológicos, como os ensaios hemolíticos, indispensáveis para a comprovação científica da eficácia terapêutica e segurança desses produtos para o consumo humano.

Nesse sentido, no presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade antitumoral e hemolítica dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia*.

## **2 PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial**

As espécies *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* foram coletadas na Fazenda Guapiara, município de Aiuroca-MG. As folhas e os frutos das espécies foram selecionados e submetidos ao processo de hidrodestilação durante 2 horas, em aparelho do tipo Clevenger modificado. O hidrolato foi coletado e centrifugado a 965,36 g por 5 minutos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010). Os óleos essenciais (OEs) obtidos foram acondicionados em frascos de vidros e armazenados sob refrigeração e na ausência de luz.

### **2.2 Atividade antitumoral *in vitro***

Os testes foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de mama (MCF7), carcinoma de fígado (HepG2), adenocarcinoma de pulmão (A549), glioblastoma (U251-MG), melanona (HT144). As linhagens A549 e HepG2 foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro-RJ. A linhagem U251-MG foi cedida pela profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira, ao passo que as linhagens MCF-7 e HT144 foram doadas pela profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli.

As culturas de células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>).

#### **2.2.1 Esquema de tratamento**

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $5 \times 10^3$  (A549 e U251-MG),  $1 \times 10^4$  (HT144) e  $2 \times 10^4$  (MCF7 e HepG2) células/poço. Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48 h com os OEs extraídos das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*, na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a observação do seu perfil de atividade frente às diferentes linhagens celulares (COSTA LOTUFO et al., 2010).

Na sequência, curvas dose-respostas foram realizadas usando diferentes concentrações dos óleos essenciais sobre a linhagem HepG2 (5, 25, 50, 100 e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os óleos foram solubilizados em DMSO para a obtenção da solução-estoque ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A partir dessa solução, novas diluições foram realizadas em meio de cultura. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5 % (v/v).

### **2.2.2 Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico (MTS) utilizando o Kit CellTiter 96TM da Promega®, comparando-se os valores de absorbância entre amostras tratadas com os valores de absorbância obtidos nas amostras controles, lidas a 490 nm (% Viabilidade celular =  $(\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{controle}}$ ) (CORY et al., 1991; MOSMANN, 1983). Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

### **2.2.3 Análise estatística**

Foi aplicado teste de variância ANOVA e Pós-teste Scott-Knott. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 ( $p < 0.05$ ). A análise foi realizada pelo software GraphPad Prism.

## 2.2 Atividade hemolítica em meio isotônico

A avaliação da atividade hemolítica dos óleos essenciais foi realizada após aprovação dos protocolos de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da UFLA (CAAE: 42467115.6.0000.5148).

O sangue de um doador voluntário foi coletado em tubos Vacutainer® contendo heparina sódica. A suspensão de eritrócitos foi centrifugada por 5 minutos a 900 g (centrífuga Fanem Baby®I Modelo 206 BL). O plasma foi removido e as células vermelhas foram suspensas em solução salina tamponada em fosfato (PBS) 5 mM, pH 7,4, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. As hemácias [100% de hematócrito (Ht)] foram diluídas para o hematócrito de 0,15% (MALHEIROS, MEIRELLES, DE PAULA, 2000; PRETÉ et al., 2011).

Alíquotas da suspensão de eritrócitos (Ht 0,15%) em solução isotônica (PBS) foram acrescidas com os óleos essenciais nas diferentes concentrações (5, 15, 30, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubadas por 60 minutos a 37 °C. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 412 nm (Shimadzu UV-160 1 PC).

O efeito hemolítico (% de hemólise) foi acompanhado medindo a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a equação: % hemólise =  $(A_a - A_{c1} / A_{c2} - A_{c1}) \times 100$ ,  $A_a$ ,  $A_{c1}$  e  $A_{c2}$  são, respectivamente, as absorbâncias da amostra, dos controles c1 (eritrócitos em PBS) e c2 (eritrócitos em água destilada) em 412 nm.

A avaliação dos controles contendo apenas o solvente utilizado para a diluição dos óleos [DMSO 1,0 % (v/v)] também foi realizada.

### **2.3 Atividade hemolítica em meio sólido**

A atividade hemolítica em meio sólido foi avaliada utilizando metodologia descrita por Wang, Shih e Huang (2004). Foram adicionados, em orifícios feitos nos géis, 5  $\mu\text{L}$  das soluções dos óleos essenciais nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 20  $\mu\text{g}$  da peçonha *Crotalus durissus terrificus* (controle indutor de hemólise). As placas permaneceram por um período de 16h em câmara de cultivo celular à 37°C. A avaliação da atividade hemolítica foi realizada pela medida do diâmetro do halo formado (mm).

### **2.4 Análise estatística aplicada nos testes de hemólise em meio sólido e meio líquido**

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 5 (4 óleos essenciais e 5 concentrações, com 3 repetições e uma testemunha como tratamento adicional (hemólise em meio sólido). O programa estatístico utilizado foi o Sisvar, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antitumoral *in vitro* dos óleos essenciais extraídos das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* foi avaliada sobre diferentes linhagens celulares. Inicialmente, os óleos foram avaliados em uma concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados mostraram que não houve uma redução significativa da viabilidade nas culturas tratadas com os óleos essenciais por 48h. Contudo, a linhagem HepG2 foi selecionada para verificar o possível efeito concentração-dependente dos óleos, por apresentar a maior redução de viabilidade para 3 dos óleos avaliados em relação às demais linhagens.

Os resultados mostraram redução de aproximadamente 10% e 11% na viabilidade celular em culturas HepG2 tratadas com o óleo essencial dos frutos de *M. alternifolia* nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Para as culturas tratadas com o óleo essencial dos frutos de *M. quinquenervia*, observou-se viabilidade celular de apenas 4% na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No entanto, não foi observada redução na viabilidade celular nas culturas submetidas ao tratamento com o óleo essencial das folhas de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*.

Pereira et al. (2014), estudando o potencial citotóxico do OE das folhas de *M. alternifolia* nas concentrações de 95, 182 e 365  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não observaram aumento nas frequências basais de micronúcleos e de aberrações cromossômicas. Dentro das limitações do estudo, os resultados demonstraram que o óleo não é genotóxico para linfócitos humanos cultivados *in vitro*, o que reafirma a baixa citotoxicidade do óleo essencial em sua totalidade, destacando a necessidade de novos estudos que avaliem seus constituintes isoladamente.

Em contrapartida, estudos de Calcabrini et al. (2004) avaliando a inibição do crescimento de células de melanoma humano (M14 WT) na presença do óleo essencial de *M. alternifolia* e do composto terpinen-4-ol, ambos nas

concentrações de 0,005 a 0,03%, constataram a indução de apoptose. Os autores sugerem que a ação do óleo e do composto terpinen-4-ol ocorreu mediante a interação deles com a membrana plasmática e com uma subsequente reorganização dos lipídeos da membrana, cujo mecanismo pode ser distinto quando esses compostos são avaliados sobre a linhagem HepG2.

Jin et al. (2010) demonstraram que o composto  $\alpha$ -pineno, componente majoritário do OE das folhas de *M. quinquenervia*, desencadeou estresse oxidativo e ativação de vias de sinalização relacionados em células tumorais A549 e HepG2. Os valores de  $CI_{50}$  do composto relacionados à redução da viabilidade celular foram de 250 e 203  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as respectivas linhagens.

Döll-Boscardin et al. (2012), estudando a citotoxicidade dos OEs extraídos das folhas jovens e adultas de *Eucalyptus benthamii* e de compostos isolados contra células HeLa derivadas de câncer cervical, observaram que os óleos essenciais apresentaram  $IC_{50}$  de 84,24 e 110,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (24 horas) e 120,57 e 101,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (72 horas), respectivamente. Entretanto, verificaram que os constituintes  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno e terpinen-4-ol, também encontrados nas espécies de *Melaleuca*, não apresentaram efeito sobre essa linhagem celular.

A Figura 1 apresenta o efeito dos óleos essenciais em eritrócitos íntegros (Ht 0,15%), sob condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4). Para os quatro tratamentos, observa-se que o aumento na concentração do óleo essencial promoveu uma potencialização da atividade hemolítica. Em baixas concentrações, o óleo das folhas (5, 15 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e frutos (5 e 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *M. alternifolia* não ocasionou a lise; entretanto, o óleo essencial extraído das folhas e frutos de *M. quinquenervia*, mesmo nas menores concentrações, apresentou efeito hemolítico. Nas concentrações mais altas, ocorre a lise total da célula e a subsequente liberação da hemoglobina. Entretanto, não foi observado dano oxidativo dessa metaloproteína nas concentrações testadas. Embora os óleos essenciais tenham apresentado baixa redução da porcentagem de células

viáveis, eles apresentaram toxicidade sobre eritrócitos, mesmo em baixas concentrações, uma vez que foram avaliados isolados e em suspensão salina.

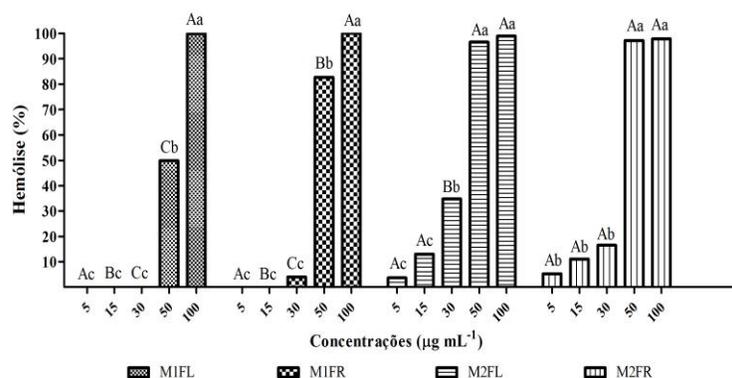


Figura 1 Porcentagem de hemólise promovida por diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* sobre eritrócitos íntegros (Ht 0,15%). Médias seguidas da mesma letra (letra minúscula representa a comparação dentro de cada tratamento e maiúscula, a comparação entre as concentrações de cada tratamento) não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

A atividade hemolítica dos óleos essenciais pode ser decorrente da lipofilicidade de alguns constituintes químicos. A membrana eritrocitária compreende uma dupla camada lipídica, sendo constituída por proteínas integrais e carboidratos. Por possuir uma composição lipídica elevada, a membrana do eritrócito pode interagir com compostos lipofílicos, como os óleos essenciais, tornando-a mais permeável e promovendo sua hemólise. Já os compostos de caráter não lipofílico podem interagir com proteínas da membrana (BAKKALI et al., 2008).

Os resultados encontrados nesse teste conduzem a uma avaliação preliminar da toxicidade dos óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*. Entretanto, de acordo com os valores de

referência do eritrograma em adultos, para homens e mulheres, a porcentagem de hematócrito varia entre 40%-52% e 36%-48%, respectivamente, e, no teste realizado, utilizou-se hematócrito 0,15% (HOFFBRAND; MOSS, 2013). Ressalta-se que os óleos essenciais poderão apresentar um comportamento distinto nas condições *in vivo*, devendo-se considerar a presença de diversas células, moléculas e condições físico-químicas inerentes a esse ambiente.

Pôde-se observar no ensaio de hemólise em meio sólido que os óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* apresentaram atividade hemolítica nas concentrações de 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto os óleos obtidos das folhas e frutos de *M. quinquenervia* não promoveram a formação de halos no meio, em comparação ao controle, nas concentrações testadas, como apresentado na Figura 2.

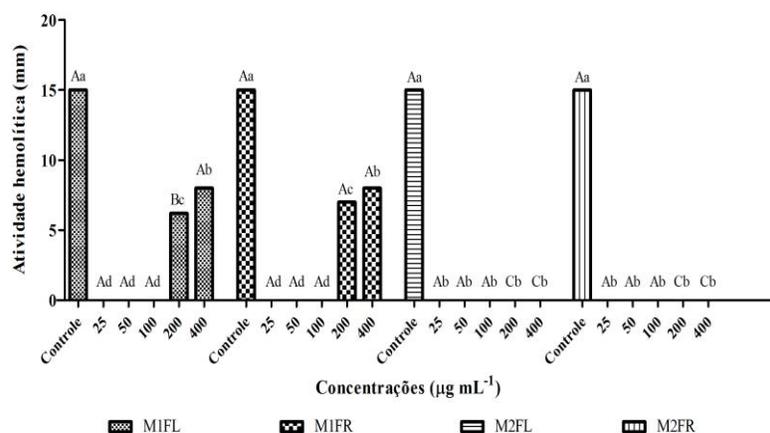


Figura 2 Diâmetro dos halos formada por diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas e frutos de *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* em meio sólido. Médias seguidas da mesma letra (letra minúscula representa a comparação dentro de cada tratamento e maiúscula, a comparação entre as concentrações de cada tratamento) não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

As fosfolipases, componentes da peçonha crotálica (controle), catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos que compõem as membranas celulares, induzindo a hemólise. Entretanto, embora os constituintes dos óleos também possam interagir com os componentes lipídicos das membranas, observou-se que os testes de hemólise em meio líquido e em meio sólido apresentaram resultados distintos. Dessa forma, é importante ressaltar que o meio e a concentração de hematócritos são fatores essenciais e podem ser responsáveis pelas variações na atividade hemolítica.

#### **4 CONCLUSÃO**

Os OEs apresentaram baixa atividade citotóxica frente à linhagem HepG2, mas apresentaram efeito citotóxico em eritrócitos, células comumente afetadas pelo tratamento com antineoplásicos. Os óleos das folhas e frutos de *Melaleuca alternifolia* apresentaram efeito hemolítico perante as duas metodologias. Já os óleos obtidos das folhas e frutos de *M. quinquenervia* apresentaram atividade somente em meio líquido.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- CABRAL, C. et al. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 65, p. 56-61, Mar. 2015.
- CALCABRINI, A. et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 122, n. 2, p. 349-360, Feb. 2004.
- CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, New York, v. 3, n. 7, p. 207-212, July 1991.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/Vania/Documents/Downloads/65-1282-5-PB.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.
- DÖLL-BOSCARDIN et al. *In vitro* cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Philadelphia, v. 2012, p. 1-8, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GOLFAKHRABADI, F. et al. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, Tehran, v. 9, n. 1, p. 104-115, June 2015.

GREAY, S. J. et al. Inhibition of established subcutaneous murine tumor growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, Philadelphia, v. 66, n. 6, p. 1095–1102, Nov. 2010.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa. **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. 124 p.

JIN, K. et al.  $\alpha$ -Pinene triggers oxidative stress and related signaling pathways in A549 and HepG2 cells. **Food Science and Biotechnology**, Philadelphia, v. 19, n. 5, p. 1325-1332, Oct. 2010.

MAHMOUDVAND, H. et al. Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. **Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 53, n. 1, p. 21-27, Feb. 2015.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysics Chemistry**, Philadelphia, v. 83, n. 2, p. 89-100, Jan. 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

PEREIRA, et al. *In vitro* genotoxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil in human lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 151, n. 2, p. 852-857, Feb. 2014.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction-A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, n. 1, p. 164-170, Jan. 2011.

REDDY, L. et al. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 1-13, July 2003.

TAHERKHANI, M. Chemical constituents and *in vitro* anticancer, cytotoxic, mutagenic and antimutagenic activities of *Artemisia diffusa*. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, New York, v. 48, n. 11, p. 729-734, Feb. 2015.

WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T. F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 324, p. 224-230, Nov. 2004.

**ARTIGO 3**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Backhousia citriodora*: ENSAIOS  
ANTIOXIDANTES, HEMOLÍTICOS, CITOTÓXICO E ANTITUMORAL**

## RESUMO

Substâncias extraídas de plantas podem constituir modelos moleculares para o desenvolvimento de novos compostos com potencial antioxidante e/ou antitumoral. Objetivou-se neste estudo caracterizar quimicamente e avaliar as atividades antioxidante, hemolítica e antitumoral do óleo essencial de folhas de *Backhousia citriodora*. O óleo essencial foi obtido pela técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado, sendo posteriormente, analisado por GC/EM e GC-DIC. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos ABTS, DPPH, fosfomolibdênio e TBARS. A citotoxicidade do óleo foi avaliada pelo método MTS, utilizando-se linhagens de células tumorais (A549, HepG2, HT144, MCF7 e U251-MG) e células normais (CCD-1059Sk). A frequência de células apoptóticas foi analisada por microscopia de fluorescência; as alterações morfológicas por microscopia de contraste e o conteúdo de DNA, nas diferentes fases do ciclo celular, por citometria de fluxo. O óleo essencial apresentou como constituinte majoritário o citral (91,19%). Observou-se elevada redução de células viáveis nas culturas A549, HepG2 e HT144, utilizando as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo essencial. Pelos métodos da captura do radical livre DPPH e redução do cátion-radical ABTS, o óleo essencial não apresentou atividade antioxidante, na faixa das concentrações utilizadas. No entanto, o óleo em estudo mostrou-se eficiente ao se utilizar os métodos TBARS (47,9 a 56,3%) e fosfomolibdênio (0,81  $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  de ácido ascórbico). No teste de hemólise em meio líquido, o óleo essencial nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentou efeito hemolítico (55 e 97%). No teste em meio sólido, o óleo apresentou atividade hemolítica apenas nas concentrações de 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O óleo essencial induziu alterações significativas na distribuição das células de linhagens neoplásicas nas diferentes fases do ciclo celular, somadas a um aumento de células apoptóticas e alterações morfológicas. Assim, os resultados obtidos ampliam a caracterização fármaco-tóxica do óleo essencial de *B. citriodora*.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Câncer. Eritrócitos. Citral.

## ABSTRACT

Substances extracted from plants can provide molecular models for the development of new compounds with antioxidant and/or antitumor potential. This study aimed to characterize chemically and evaluate the antioxidant, hemolytic and antitumor activity of essential oil from *Backhousia citriodora* leaves. The essential oil was obtained through hydrodistillation technique, using a modified Clevenger apparatus, being later analyzed through GC/MS and GC-FID. The antioxidant activity was evaluated through the methods ABTS, DPPH, phosphomolybdenum and TBARS. The oil cytotoxicity was evaluated through MTS method using tumor cell lines (A549, HepG2, HT144, U251-MG, and MCF7) and normal cells (CCD-1059Sk). The frequency of apoptotic cells was analyzed by fluorescence microscopy; morphological changes in contrast microscopy and their DNA content in the many phases of the cell cycle by flow cytometry. The essential oil presented as major constituent citral (91.19%). There was a high reduction in viable cells in cultures A549, HepG2 and HT144 using concentrations of 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the essential oil. Through the methods of capturing the free radical DPPH and reduction of ABTS cation radical, the essential oil showed no antioxidant activity in the range of concentrations used. However, the oil under study proved efficient when using the TBARS methods (the 47.9 56.3%) and phosphomolybdenum (0.81  $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  ascorbic acid). The hemolysis test in liquid medium, the essential oil in concentrations of 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in isotonic physiological conditions of osmolarity and pH to 0.15% hematocrit, showed a hemolytic effect (55% and 97%). In the test on solid medium, the oil showed hemolytic activity only at concentrations of 200 and 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The essential oil induced significant changes in the distribution of neoplastic cell lines in different phases of the cell cycle, along with an increase of apoptotic cells and morphological changes. Thus, the results extend the toxic-drug characterization of the essential oil from *B. citriodora*.

Keywords: Oxidative stress. Cancer. Erythrocytes. Citral.

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos descrevem a participação do estresse oxidativo em diversas doenças, como o câncer. Inúmeras vias de sinalização intracelulares ligadas à doença são reguladas por espécies reativas de oxigênio (EROs), mas ainda pouco se sabe como evitar os danos causados pelo seu excesso. A inter-relação do estresse oxidativo com a epigenética também é de grande interesse, já que ambos parecem estar intimamente conectados com processos de progressão tumoral. Há, certamente, um grande campo a ser estudado, no que se refere a uma melhor compreensão de todos os mecanismos reguladores e regulados pelo estresse oxidativo e sua possível aplicação em prevenção, diagnóstico precoce e tratamento do câncer. (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

As plantas, normalmente, são capazes de produzir compostos antioxidantes para controlar o estresse oxidativo causado pela radiação solar e oxigênio atmosférico. Dessa forma, os produtos naturais podem representar fontes promissoras de compostos que apresentem propriedades antioxidantes e, conseqüentemente, atuarem na prevenção e tratamento do câncer.

Existem muitos exemplos de fármacos que foram produzidos por meio de fontes naturais, como a vimblastina e a vincristina, utilizados nos tratamentos contra o câncer (CRAGG; NEWMAN, 2005). Contudo, a alta toxicidade desses compostos e a resistência comumente observada em alguns tipos de tumores têm motivado a busca por novas propostas terapêuticas.

O citral, constituinte majoritário do óleo essencial de *Backhousia citriodora* (murta-limão), é citado como sendo o responsável pelas atividades atribuídas ao óleo, já que apresenta atividades farmacológicas, como efeito anti-inflamatório sinérgico, em associação com naproxeno (ORTIZ et al., 2010), efeito antitumoral (NEGRELLE; GOMES, 2007) e antinociceptivo quando administrado via oral (NISHIJIMA et al., 2014), podendo a espécie *B. citriodora*

apresentar uma significativa atividade antitumoral devido à presença do monoterpeno citral.

Além da elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação, faz-se necessária a ampla prospecção dos aspectos toxicológicos e farmacológicos para comprovar a eficácia terapêutica e a segurança de uso desses compostos.

Os objetivos neste trabalho foram avaliar as atividades antioxidante, hemolítica, citotóxica e antitumoral do óleo essencial de *B. citriodora*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial**

A espécie *Backhousia citriodora* foi coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG/Brasil, e encaminhada para o Laboratório de Química Orgânica- Óleos Essenciais do Departamento de Química da UFLA. As folhas foram selecionadas e submetidas ao processo de hidrodestilação durante 2 horas, em aparelho do tipo Clevenger modificado. O hidrolato foi coletado e centrifugado a 965,36 g por 5 minutos. Posteriormente, o óleo essencial foi retirado, acondicionado em frasco de vidro envolto com papel-alumínio e armazenado sob refrigeração (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010).

A identificação da espécie foi realizada pela doutora Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia da UFLA.

### **2.2 Determinação da umidade e rendimento das extrações**

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL, acoplado a um condensador com coletor graduado Dean-Stark, foram colocados 5 g do material vegetal com 80 mL de cicloexano. Após 2 horas, o volume de água foi medido para o cálculo do rendimento das extrações em Base Livre de Umidade (%p/p BLU) (PIMENTEL et al., 2006).

### **2.3 Caracterização química do óleo essencial**

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes do óleo essencial foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (DIC) Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura foi mantida a 50°C por 2 min, depois aumentada 4°C min<sup>-1</sup>, até atingir 200°C. Em seguida, aumentada 15°C min<sup>-1</sup>, até atingir 300°C, mantendo-se essa temperatura constante por 15 min; a temperatura do injetor foi 250°C e a temperatura do detector (ou interface), de 280°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL da diluição do óleo essencial em acetato de etila.

A análise qualitativa foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida (J&W Scientific) 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano de 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas da análise foram as mesmas utilizadas para CG/DIC. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 e V; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos s<sup>-1</sup> e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Utilizou-se também, para a identificação dos constituintes, a comparação de seus índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado empregando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas, NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

#### **2.4 Avaliação da atividade antioxidante**

Os óleos essenciais e os antioxidantes sintéticos BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) ou ácido ascórbico foram avaliados nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250, 500 e 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

#### 2.4.1 Método ABTS

A formação do cátion radical ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes et al. (2010) e Guerreiro et al. (2013). O radical é formado pela reação da solução ABTS<sup>•+</sup> 7mM com a solução de persulfato de potássio 2,45 mM, incubados à temperatura de 25°C e no abrigo de luz, durante 12-16h. Após esse período, 100  $\mu\text{L}$  de óleo essencial foram adicionados a 1900  $\mu\text{L}$  da solução do radical ABTS<sup>•+</sup>. A absorvância foi monitorada espectrofotometricamente a 735 nm, durante 6 min (Shimadzu 160-UV). A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS<sup>•+</sup> atuaram como controle negativo e, como controle positivo, utilizou-se o BHT. A porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito de captação do radical} = [(A_{\text{CN}} - A_{\text{Am}}) / A_{\text{CN}}] * 100$$

Em que:

$A_{\text{CN}}$  = Absorvância do controle negativo

$A_{\text{Am}}$  = Absorvância da amostra

#### 2.4.2 Método DPPH

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz et al. (2008) e Guimarães et al. (2011), seguidas de pequenas modificações. Uma solução metanólica de DPPH foi preparada na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição do óleo essencial em metanol. Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o óleo essencial. Utilizou-se como controle positivo o BHT. Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1PC) no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{AA\%} = [(A_{\text{CN}} - A_{\text{Amo}}) / A_{\text{CN}}] * 100$$

Em que:

$A_{\text{Amo}}$  = Absorbância do DPPH com a amostra.

$A_{\text{CN}}$  = Absorbância do DPPH com o metanol.

### 2.4.3 Método do TBARS

Em um tubo de ensaio, foi adicionado 0,5 mL de gema de ovo homogeneizada em água (10% p/v) (como fonte de lipídeos) e 0,1 mL das diluições do óleo essencial. Em seguida, adicionaram-se 0,1 mL da solução  $[\text{FeSO}_4\text{-EDTA}]$  6mM, 0,1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 0,2 mL de água destilada. Posteriormente, adicionaram-se 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,8% (p/v) em dodecilsulfato de sódio 1,1% (p/v). Para o controle negativo, utilizou-se 0,1 mL de metanol e, para o controle

positivo, utilizou-se o BHT. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida por 1 h em banho-maria a 95 °C. Após o resfriamento das amostras (temperatura ambiente), colocaram-se 2,5 mL de butan-1-ol em cada tubo de ensaio e centrifugou-os por 10 min a 3000 g. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm (Bounatirou et al., 2007). Todos os valores foram expressos em porcentagem da atividade antioxidante (%AA), calculados por meio da fórmula:  $\%AA = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] \times 100$ , ( $A_{CN}$  = Absorvância do controle negativo;  $A_{Am}$  = Absorvância da amostra).

#### **2.4.4 Complexo fosfomolibdênio**

Uma alíquota de 0,1 mL das soluções dos óleos essenciais diluídos em etanol foi adicionado em um tubo de ensaio com 1 mL de solução de reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, 28 mM de fosfato de sódio, molibdato de amônio e 4 mM). Os tubos foram tampados e incubados em um banho-maria a 95°C durante 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, realizou-se a leitura a 695 nm *versus* um branco (solução contendo 1 mL da solução do reagente e 0,1 mL de etanol) (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A capacidade antioxidante foi expressa em relação ao ácido ascórbico.

#### **2.4.5 Análises estatísticas**

Os experimentos foram submetidos à análise de variância, seguida pelo Teste F, para verificar o efeito das concentrações sobre a atividade antioxidante do óleo essencial e do padrão. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (2 X 7), sendo duas amostras analisadas (BK e um antioxidante sintético: BHT ou ácido ascórbico) e sete concentrações (750, 500, 250, 200, 150, 100, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com três repetições. As análises

foram realizadas utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011) e, por meio do teste de média Scott Knott, as médias das atividades antioxidantes foram comparadas.

## **2.5 Atividade hemolítica em meio isotônico**

A avaliação da atividade hemolítica do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Bioquímica (DQI/UFLA), após aprovação dos protocolos de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da UFLA (CAAE: 42467115.6.0000.5148).

O sangue de um doador voluntário foi coletado em tubos Vacutainer® contendo heparina sódica.

A suspensão de eritrócitos foi centrifugada por 5 minutos a 900 g. O plasma foi removido e as células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato (PBS) 5 mM, pH 7,4, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições desse processo, obteve-se um concentrado de hemácias que foi mantido sob refrigeração (4°C). Esse concentrado de hemácias [100% de hematócrito (Ht)] foi diluído para o hematócrito de 0,15% (MALHEIROS; MEIRELLES; DE PAULA, 2000; PRETÉ et al., 2011).

A suspensão de eritrócitos (Ht 0,15%) em solução isotônica (PBS) foi acrescida com o óleo essencial nas diferentes concentrações (5, 15, 30, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubada por 60 minutos a 37°C. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 412 nm (Shimadzu UV-160 1 PC). Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração do óleo essencial e também para os controles: c1, eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e c2, eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total) (PRETÉ et al., 2011).

O efeito hemolítico (% de hemólise) foi acompanhado medindo a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100$$

Em que:

$A_a$ ,  $A_{c1}$  e  $A_{c2}$  são respectivamente as absorbâncias da amostra, dos controles c1 e c2 em 412 nm.

### 2.5.1 Análise estatística

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem de hemólise em relação às concentrações analisadas, empregando o software GraphPad Prism versão 5.01.

### 2.5.2 Atividade hemolítica em meio sólido

A atividade hemolítica em meio sólido foi avaliada utilizando metodologia descrita por Wang, Shih e Huang (2004). Foram adicionados, em orifícios feitos nos géis, 5 $\mu$ L das soluções dos óleos essenciais nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e 20  $\mu$ g da peçonha *Crotalus durissus terrificus* (controle indutor de hemólise). As placas permaneceram por um período de 16h em câmara de cultivo celular a 37°C. A avaliação da

atividade hemolítica foi realizada pela medida do diâmetro do halo formado (mm).

## **2.6 Ensaio antitumoral e citotóxico *in vitro***

A avaliação das atividades antitumoral e citotóxica do óleo essencial de *B. citriodora* foi realizada no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), Departamento de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

### **2.6.1 Linhagens celulares e condições de cultivo**

Os testes foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de fígado (Hep G2), adenocarcinoma de pulmão (A549), glioblastoma (U251-MG), melanona (HT144) e em células normais de fibroblastos de pele (CCD-1059Sk). As linhagens A549, Hep G2 e CCD-1059Sk foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro-RJ. A linhagem U251-MG foi cedida pela profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira, ao passo que as linhagens MCF-7 e HT144 foram doadas pela profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli.

As culturas de células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>)

### **2.6.2 Esquema de tratamento**

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $5 \times 10^3$  (A549 e U251-MG),  $1 \times 10^4$  (HT144) e  $2 \times 10^4$  (MCF-7 e Hep G2) células/poço. Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48 h com o óleo essencial na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a observação do perfil de sua atividade frente às diferentes linhagens celulares.

Na sequência, curvas dose-resposta foram realizadas usando diferentes concentrações do óleo essencial sobre as linhagens A549, HepG2, HT144 e células normais de CCD-1059Sk (5, 10, 25, 50 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O óleo foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) para a obtenção da solução-estoque ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A partir dessa solução, novas diluições foram realizadas em meio de cultura. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5 % (v/v).

### 2.6.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico (MTS) utilizando o Kit CellTiter 96TM da Promega®. Esse ensaio baseia-se na conversão do sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio] (MTS) (amarelo) em formazano (marrom-acastanhado), via enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria de células viáveis.

A quantidade produzida de formazano, um composto solúvel em meio de cultura que absorve luz a 490 nm, é diretamente proporcional ao número de células vivas (CORY et al., 1991). A viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre amostras tratadas com os valores de absorbância obtidos nas amostras-controles. Os experimentos foram realizados em triplicata, repetidos duas vezes e os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão e mediante ao cálculo do  $\text{IC}_{50}$  (concentração requerida para reduzir em 50% a proliferação celular).

$$\% \text{ Viabilidade celular} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

#### 2.6.4 Análise do ciclo celular

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com inóculo de  $8 \times 10^4$  (A549) e  $1 \times 10^5$  (HepG2 e HT144). Após 24 horas de aderência, as células foram tratadas com óleo essencial nas concentrações de 25 e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 24 e 48 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática e transferidas para tubos Falcon. As células foram fixadas com etanol gelado e mantidas a  $8^\circ\text{C}$ . Após centrifugação (900 g por 5 minutos), o pellet formado foi lavado com PBSA (ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico) e, posteriormente, foi ressuspenso em uma solução contendo 15  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 15  $\mu\text{L}$  de RNase ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  de PBSA. As amostras foram incubadas por 30 min, ao abrigo da luz. Em seguida, adicionaram-se 150  $\mu\text{L}$  de PBSA e as amostras foram adicionadas à placa de leitura e analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCyte 8HT, Millipore), utilizando-se o software GuavaSoft 2.7 (ZANIN et al., 2015).

#### 2.6.5 Teste Túnel

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com inóculo de  $8 \times 10^4$  (A549) e  $1 \times 10^5$  (HepG2 e HT144). Após 24 horas de aderência, as células foram tratadas com óleo essencial nas concentrações de 25 e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 24 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática e transferidas para tubos Falcon. Após centrifugação (900 g por 5 minutos), o pellet formado foi homogeneizado com PBSA. As células foram então fixadas com 50  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído 4% por 30 minutos a  $8^\circ\text{C}$ . Em seguida, após centrifugação, o pellet formado foi ressuspenso em etanol 70% gelado e

armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por, no mínimo, duas horas. As amostras foram lavadas com  $200\ \mu\text{L}$  de “Washing Buffer” (duas vezes), centrifugadas e o pellet foi ressuspensão em  $25\ \mu\text{L}$  de DNA “Labeling Mix”. As amostras foram incubadas por 1 hora, em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , protegidas da luz. Em seguida, adicionaram-se  $200\ \mu\text{L}$  de “Rinsing Buffer” e, após centrifugação, o pellet foi ressuspensão em  $50\ \mu\text{L}$  de “Anti-BrdU Staining”. Após incubação por 30 min à temperatura ambiente, adicionaram-se  $150\ \mu\text{L}$  de “Rinsing Buffer”; as amostras foram distribuídas à placa de leitura e analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCyte 8HT, Millipore), utilizando-se o software GuavaSoft 2.7.

#### **2.6.6 Análise estatística**

Foi aplicado teste de variância ANOVA e Pós-teste Scott-Knott. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p$  foi inferior a 0,05 ( $p < 0.05$ ). A análise foi realizada pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização química do óleo essencial

O composto majoritário encontrado no óleo essencial (OE) foi o citral, constituído pela mistura dos aldeídos isoméricos neral e geranial, nas proporções de 39,82% e 51,37%, respectivamente.

Estudos de Southwell et al. (2000) também demonstraram que *B. citriodora* é uma espécie rica em citral, podendo ser comparada às espécies de lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon citratus*). Na avaliação da composição química de óleos essenciais das folhas de murta-limão, encontraram os compostos mirceno (0,1-0,7%), 6-metil-5-hepten-2-ona (0,1-2,5%), linalol (0,3-1,0%), citronelal (0,1-0,9%), iso-neral (0,6-2,7%), iso-geranial (1,0-4,2%), neral (32,0-40,9%) e geranial (46,1-60,7%), nas respectivas proporções.

De acordo com Nhu-Trang, Casabianca e Grenier-Loustalot (2006), o óleo essencial de *B. citriodora* encontrada em florestas nas regiões tropicais e subtropicais da Austrália apresentam elevado conteúdo de citral (> 80%). A variabilidade observada na composição química dos óleos essenciais extraídos da mesma espécie botânica proveniente de diferentes países relaciona-se, possivelmente, aos distintos locais de coleta, tipos de extração, quimiotipos, ciclos vegetativos e fatores edafoclimáticos a que essas espécies estão submetidas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; AFOULOUS et al., 2013).

#### 3.2 Atividade antioxidante

Os resultados das atividades antioxidantes estão apresentados na Figura 1.

Verificou-se que o óleo essencial não apresentou atividade antioxidante perante os ensaios com cátion-radical ABTS e DPPH, em comparação com o controle BHT.

Com resultados similares, Guimarães et al. (2011), avaliando as propriedades antioxidantes do óleo essencial de capim-limão e do seu composto majoritário citral, constataram, para ambos, baixa atividade antioxidante perante a metodologia que avalia a redução do radical DPPH. Esse fato pode ser justificado devido à dificuldade de doação de um hidrogênio por parte desses compostos para neutralizar o radical. O ABTS, também, na ausência de compostos fenólicos, é estável, mas reage energeticamente com um doador de átomos de hidrogênio, sendo convertido em uma forma não colorimétrica.

Os valores de absorbância obtidos pelo método do fosfomolibdato mostrou que o óleo essencial foi mais eficiente que o ácido ascórbico na concentração de  $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Em concentrações inferiores, o óleo essencial apresentou atividade semelhante ao composto referência. Foi encontrado um valor de  $0,81 \mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$  equivalente ao ácido ascórbico.

Empregando-se a metodologia que avalia a atividade antioxidante pela inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), observou-se que o óleo essencial apresentou atividade antioxidante inferior ao BHT, em todas as concentrações avaliadas. Verificou-se uma atividade entre 47,9% a 56,3%, não havendo diferenças significativas entre as concentrações do óleo.

A diferença entre os resultados das metodologias utilizadas pode ser decorrente de vários fatores, como a estrutura física do sistema de ensaio, a natureza do substrato para oxidação, a interação entre os compostos utilizados, entre outros.

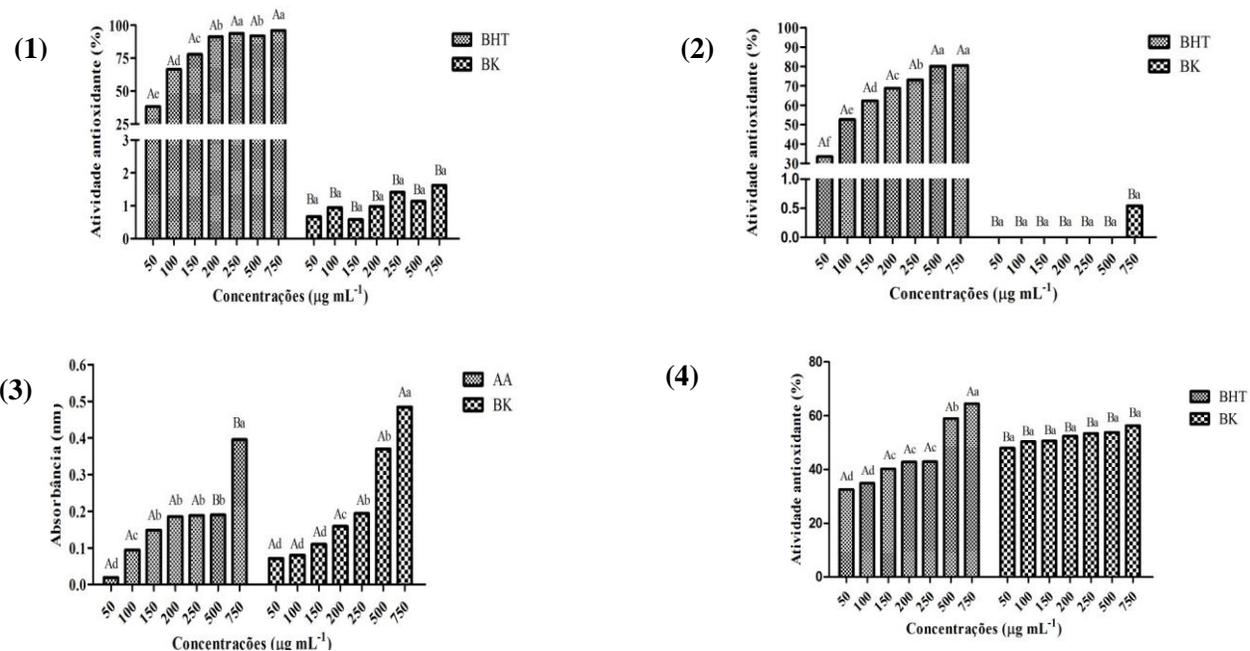


Figura 1 Atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *Backhousia citriodora* (BK) determinada através de diferentes ensaios: (1) ABTS; (2) DPPH; (3) Foscimolibdênio; (4) TBARS. Médias seguidas da mesma letra (letra minúscula representa a comparação dentro de cada tratamento e maiúscula, a comparação entre as concentrações de cada tratamento) não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

### 3.3 Atividade hemolítica

Na análise do perfil hemolítico do óleo de *B. citriodora* em meio líquido (Ht 0,15%) (Figura 2), observou-se que nas concentrações de 5, 15, 20 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o efeito hemolítico se manteve constante. Já nas concentrações mais elevadas, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , constatou-se, aproximadamente, 55% e 97% de hemólise, respectivamente. Estudos de Gomes et al. (2014) demonstraram elevadas porcentagens de hemólise na presença do citral; dessa forma, sugere-se que esse composto seja o responsável pela atividade do óleo essencial de *B. citriodora*.

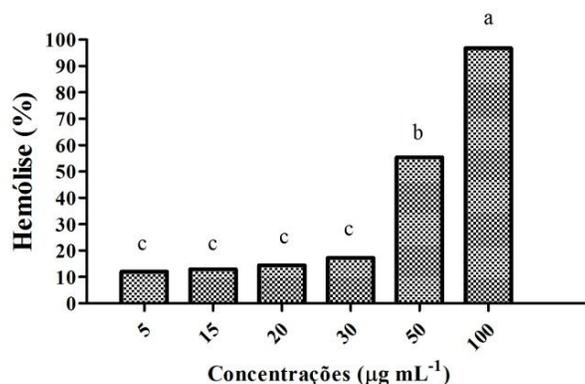


Figura 2 Porcentagem de hemólise promovida por diferentes concentrações do óleo essencial de *B. citriodora* sobre eritrócitos íntegros (Ht 0,15%). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Os resultados encontrados nesse teste sugerem uma possível toxicidade para o óleo essencial. Entretanto, de acordo com os valores de referência do eritrograma em adultos, para homens e mulheres, a porcentagem de hematócrito

varia entre 40%-52% e 36%-48%, respectivamente, e, no teste realizado, utilizou-se hematócrito 0,15% (HOFFBRAND; MOSS, 2013). É importante salientar que os óleos essenciais poderão apresentar um comportamento distinto nas condições *in vivo*, devido à presença de diversas células, moléculas e às condições físico-químicas inerentes a esse ambiente.

Para o ensaio de hemólise em meio sólido, o OE apresentou atividade hemolítica apenas nas concentrações de 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (5 e 7,5 mm, respectivamente).

Observaram-se resultados distintos na avaliação de hemólise em meio líquido e em meio sólido, possivelmente devido a diferenças metodológicas, como a barreira física promovida pelo ágar em meio sólido e diferentes concentrações de eritrócitos.

A atividade hemolítica dos óleos essenciais pode estar relacionada, principalmente, à sua capacidade de interagir com as membranas, uma vez que apresentam propriedades lipofílicas. Podem alterar a permeabilidade da membrana eritrocitária e promover a hemólise (BAKKALI et al., 2008).

### **3.4 Atividades citotóxica e antitumoral**

A avaliação da atividade citotóxica sobre linhagens tumorais e normal humanas do óleo essencial de *B.citriodora* (BK) foi realizada por meio de diferentes abordagens experimentais. Inicialmente, foram realizados ensaios de viabilidade celular por teste colorimétrico (MTS). Nesta varredura, utilizou-se o óleo na concentração de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados mostraram maior redução de viabilidade celular em culturas de A549, HepG2 e HT144; assim, essas linhagens foram selecionadas para verificação do efeito dose-dependente do óleo essencial.

Após a obtenção de resultados utilizando-se diferentes doses crescentes (Figura 3), foi observado que o tratamento com o óleo promoveu maior redução da viabilidade celular com o aumento da concentração utilizada. O óleo essencial nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contribuiu para diminuir o percentual de células vivas na linhagem A549 em, aproximadamente, 33,2; 73,0 e 89,0%, respectivamente. Nas outras linhagens, a viabilidade celular também foi afetada, observando-se redução de 15,15; 20,10; 56,30 e 88,84% para HepG2 e de 7,8; 59,8; 69,9 e 81,7% para HT144, nas respectivas concentrações: 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Estudos de Hayes e Markovic (2002) avaliando o efeito, *in vitro*, do óleo essencial de *B. citriodora* em células de hepatocarcinoma constataram a presença de citotoxicidade, corroborando os resultados obtidos para HepG2.

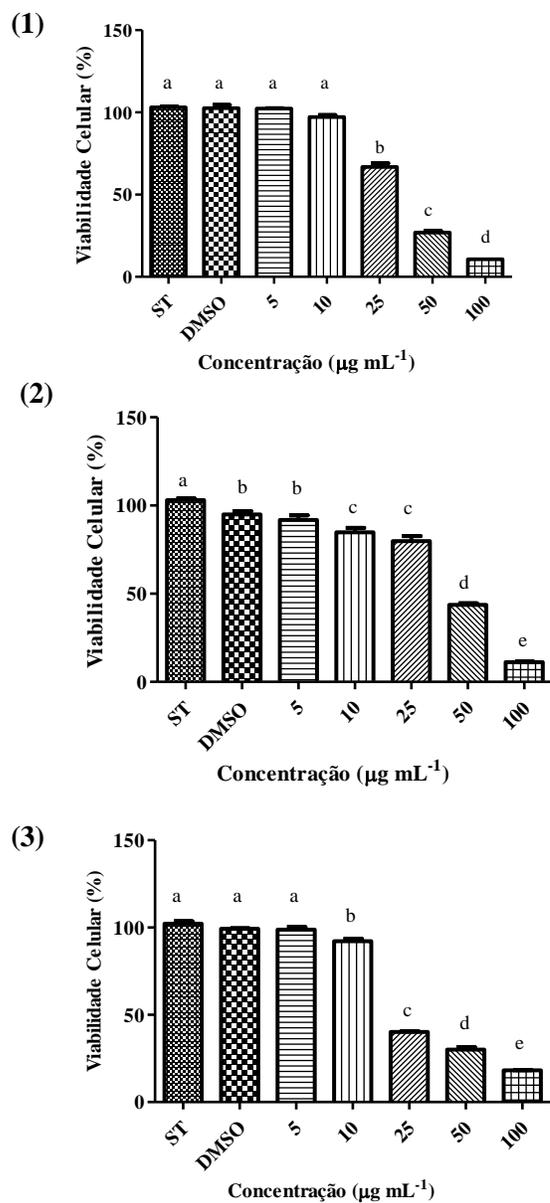


Figura 3 Viabilidade celular (%) determinada pelo teste MTS em culturas de células de (1) A549, (2) HepG2 e (3) HT144 tratadas com o óleo essencial de *Backhousia citriodora* em diferentes concentrações por 48h. Cada valor representa a média  $\pm$  erro padrão. (ST= sem tratamento; DMSO= dimetilsulfóxido).

Além disso, sabe-se que é importante a investigação da citotoxicidade em linhagens não tumorais, uma vez que, se o tecido normal e o tumoral exibirem sensibilidade similar ao composto e/ou medicamento, não haverá janela terapêutica e, na concentração em que o tumor responder, a célula normal responderá também e o tecido será danificado (HOFMANN, 2008). Dessa forma, realizou-se o teste de viabilidade celular com células normais de fibroblastos humanos, linhagem CCD-1059Sk. Os valores de  $CI_{50}$  obtidos para as linhagens tumorais e normal estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Valores de  $CI_{50}$  obtidos na análise de viabilidade celular para células tumorais e normal, utilizando o óleo essencial de *B. citriodora*

<b>Linhagem celular</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
A549	33,84 $\pm$ 2,39
HepG2	43,21 $\pm$ 2,04
HT144	26,47 $\pm$ 1,65
CCD-1059Sk	45,00 $\pm$ 4,81

A partir desses resultados, pôde-se calcular a dose de citotoxicidade do óleo essencial com relação às células normais (100%). Foram obtidas reduções de  $IC_{50}$  de aproximadamente 25, 4 e 42% para A549, HepG2 e HT144, respectivamente, destacando a importância da utilização do óleo de *B. citriodora*, uma vez que doses menores mostraram-se citotóxicas sobre as células tumorais em comparação ao controle (células normais).

Os efeitos citotóxicos dos óleos essenciais podem estar relacionados com danos na membrana celular ou alterações em sua permeabilidade. No citoplasma, essas substâncias podem interromper as vias metabólicas específicas

de lipídeos e proteínas ou estimular a despolarização das membranas mitocondriais, o que pode levar à necrose celular ou apoptose.

Estudos relatam que os constituintes dos OEs são potentes na prevenção e tratamento do câncer (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014). Sobral et al. (2014) mostram, por meio de estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, que a atividade antitumoral de OEs de muitas espécies tem sido relacionada com a presença de compostos monoterpênicos; como exemplo dessa classe de compostos, tem-se o citral, principal constituinte do óleo de *B. citriodora*.

Por conseguinte, para investigar se os efeitos dos tratamentos com OE estão relacionados à interrupção do ciclo celular (efeito antiproliferativo) e/ou morte celular (efeito citotóxico), realizou-se a análise das diferentes populações celulares distribuídas no ciclo celular por quantificação de DNA. Os perfis representativos das fases do ciclo celular obtidos após tratamento das culturas de linhagens tumorais A549, HepG2 e HT144 com OE (25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) estão representados na Figura 4.

Na análise do ciclo celular (Tabela 2), foi observado que OE induziu um aumento da fração sub-G1 e diminuição simultânea em G0/G1, S (24h) e G2/M (24 e 48h) para a linhagem A549, o que ocorreu de modo semelhante para HT144, com exceção da fase G2/M, na qual houve um aumento no número de células.

Os resultados mostram que houve um aumento significativo na população sub-diplóide (pico sub-G1) e redução nas fases subsequentes G0/G1, S e G2/M na linhagem HepG2 após os tratamentos com OE nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por 24 e 48h., o que sugere indução de morte celular.

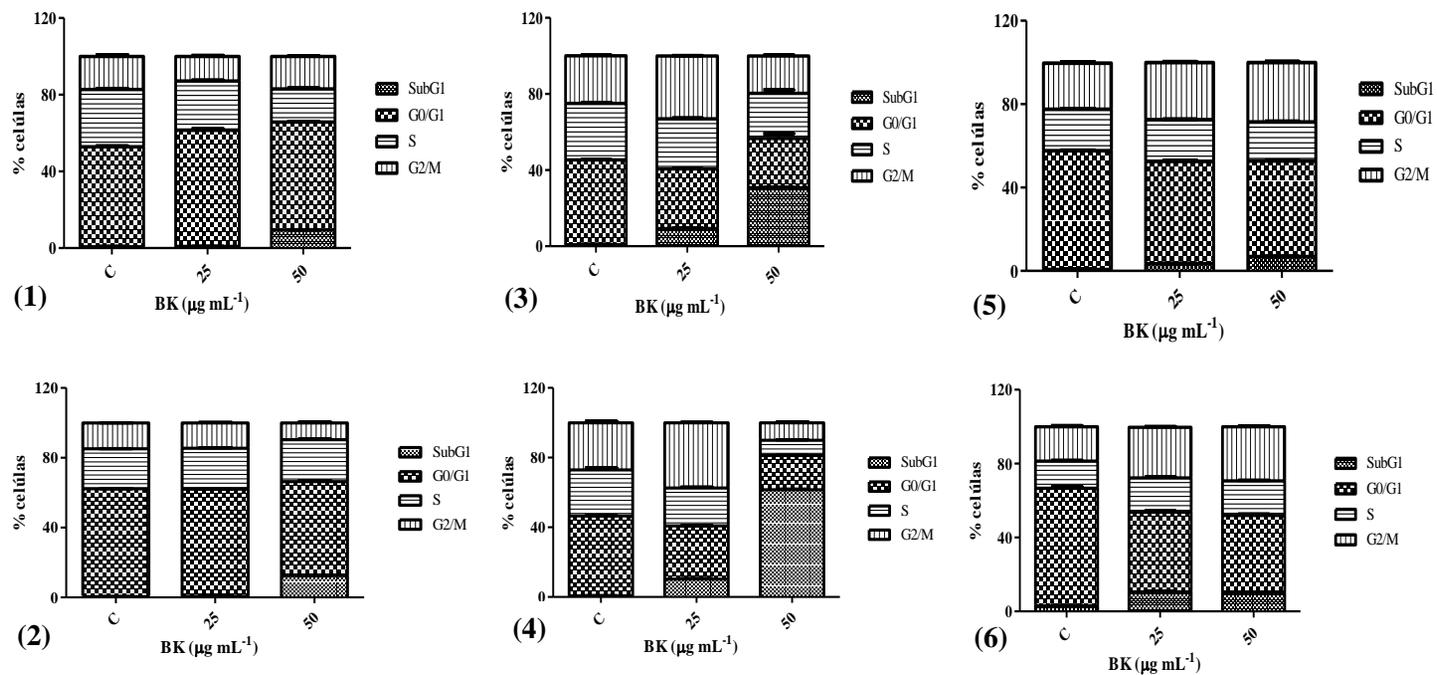


Figura 4 Análise do ciclo celular de linhagens tumorais A549 (1 e 2), HepG2 (3 e 4) e HT144 (5 e 6) submetidas ao tratamento com o óleo essencial de *B. citriodora* (25 e 50 µg mL<sup>-1</sup>) por diferentes períodos (24 e 48h, respectivamente). Cada valor representa a média ± erro padrão.

Tabela 2 Conteúdo de DNA (%) nas diferentes fases do ciclo celular de culturas neoplásicas (A549, HepG2 e HT144) submetidas ao tratamento com o óleo essencial de *B. citriodora* (25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24 e 48hs.

Linhagens	Tratamento ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fases do ciclo celular							
		%Sub-G1		%G0/G1		% em S		%G2/M	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
A549	Controle	0,68±0,22b	0,40±0,06b	52,18±0,76c	61,82±0,30a	29,94±0,73a	22,97±0,17a	17,18±1,52a	14,71±0,20a
	25	0,80±0,12b	0,64±0,10b	60,69±1,15a	61,37±0,10a	25,62±0,83b	23,43±0,54a	12,85±0,84b	14,54±0,45a
	50	9,44±0,22a	12,47±0,33a	56,26±0,47b	53,92±0,75b	17,32±0,78c	23,98±0,49a	16,95±0,56a	9,60±0,58b
HepG2	Controle	0,78±0,15c	0,66±0,13c	44,59±0,03a	45,90±0,15a	29,65±0,47a	26,34±1,11a	24,98±0,35b	27,07±0,82b
	25	9,27±0,25b	10,23±0,29b	31,41±0,02b	30,65±0,02b	26,27±0,41b	21,63±0,56b	33,02±0,14a	37,46±0,24a
	50	30,70±0,33a	61,65±0,32a	25,94±2,55c	19,71±0,13c	23,72±1,77c	8,66±0,36c	19,62±0,44c	10,05±0,55c
HT144	Controle	0,65±0,47c	3,10±0,09b	56,96±0,45a	63,56±1,52a	19,94±0,55a	14,73±0,62b	22,07±1,03b	18,59±1,00c
	25	3,47±0,22b	10,56±0,60a	49,04±0,95b	43,19±0,97b	20,09±0,19a	18,47±0,96a	27,38±0,60a	27,47±0,61b
	50	6,85±0,09a	9,90±0,22a	45,93±0,53c	42,01±1,20b	18,65±0,45b	18,70±0,53a	28,51±0,86a	29,36±0,77a

Como observado na análise do ciclo celular, o aumento de células em sub G1 deve-se a mecanismos capazes de promover a fragmentação de DNA, indicando a ocorrência de morte celular. Portanto, frente ao potencial citotóxico do tratamento com OE nas linhagens estudadas, a investigação do tipo de morte celular envolvida com a atividade observada tornou-se particularmente importante.

A apoptose é um processo de morte celular com alterações bioquímicas e morfológicas características. Geralmente, as células tumorais apresentam falha nos mecanismos envolvidos nesse processo. Uma característica desse tipo de morte é a fragmentação internucleossômica do DNA que gera fragmentos com quebras de cadeia dupla (DSBs), permitindo o acesso 3'-hidroxil (3'-OH) terminal. Essa característica constitui a base para um método de detecção de apoptose bem estabelecido : TUNEL- *Terminal desoxinucleotidil transferase dUTP Nick End Labeling* (DARZYNKIEWICZ; GALKOWSKI; ZHAO, 2008).

Os dados apresentados nos gráficos (Figura 5) e nos histogramas (Figura 6) mostram que houve um aumento significativo na frequência de apoptose nas linhagens tratadas com o OE. Para HT144, foi observado, respectivamente, 39,6 e 64,9% de células em apoptose, após tratamento com 25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de OE, por 24 horas. Já em HepG2, verificou-se 29,1 e 38,0% de células em apoptose, nas mesmas concentrações do óleo. Para a linhagem A549, constatou-se baixo percentual de células apoptóticas. Os resultados sugerem que o OE é mais eficiente em induzir apoptose nas linhagens HT144 e HepG2 e que os mecanismos envolvidos na atividade citotóxica observada para a linhagem A549 possivelmente não estão relacionados ao processo de morte celular por apoptose.

A degradação celular e as alterações observadas em células apoptóticas são decorrentes da ativação de caspases (cisteíno proteases) presentes nas células num estado inativo, que estão envolvidas especificamente nos mecanismos

moleculares de morte celular programada. São ativadas em resposta a estímulos externos, tais como os ligantes para receptores de morte (na via extrínseca da apoptose) ou sinais internos que surgem a partir de danos aos componentes celulares (na via intrínseca da apoptose) (DUNCAN et al., 2010).

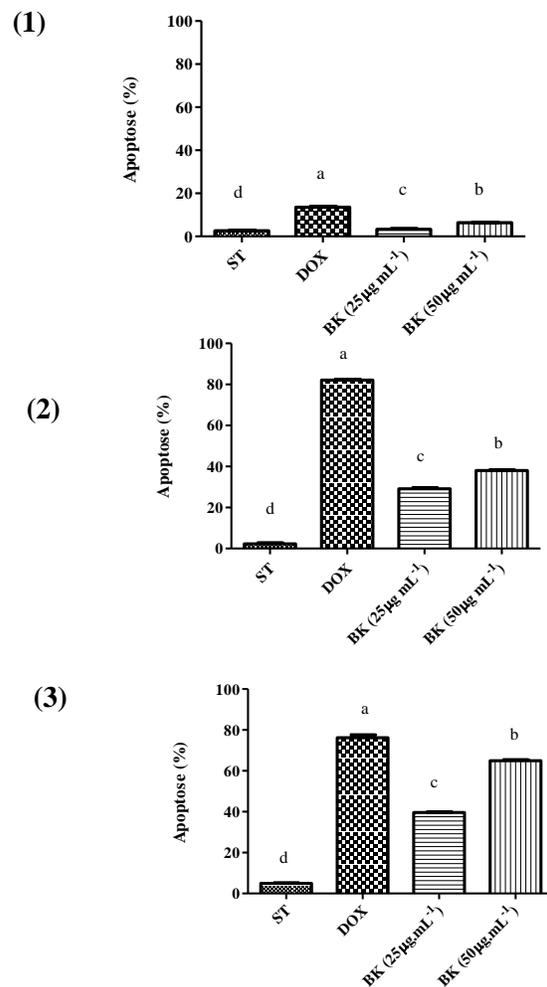
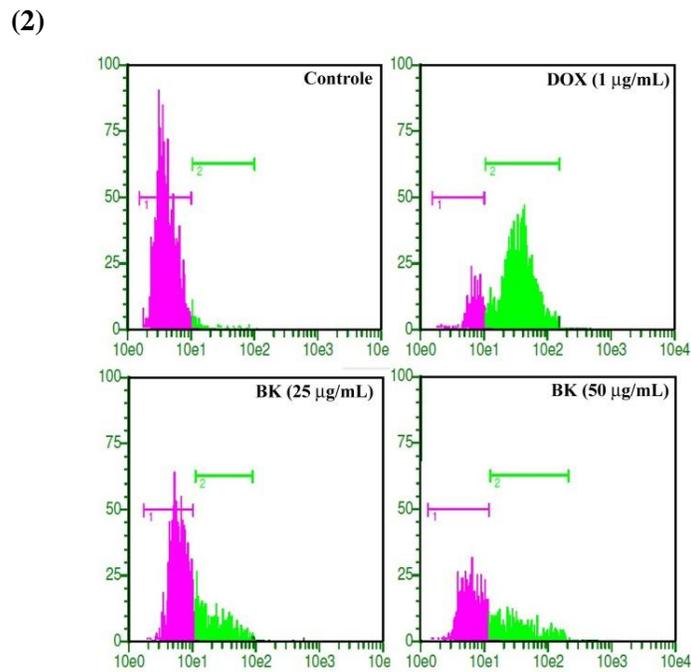
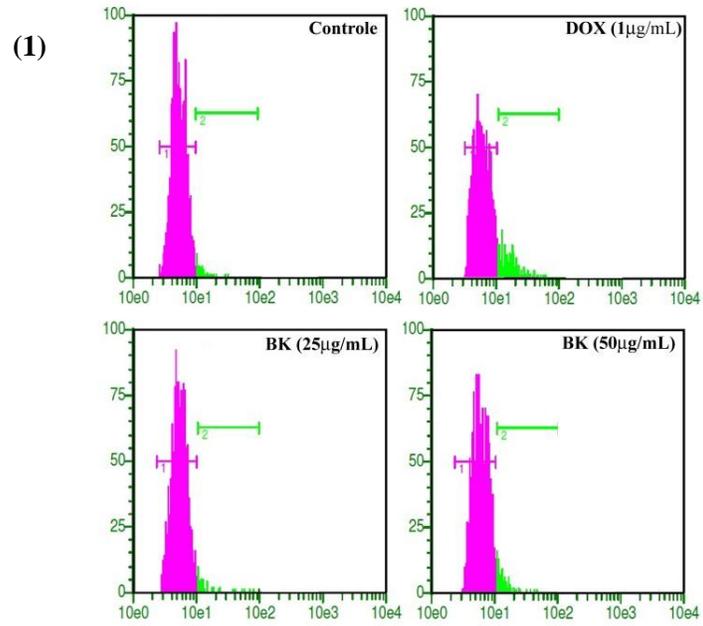


Figura 5 Frequência de apoptose das culturas de células das diferentes linhagens: (1) A549; (2) HepG2 e (3) HT144, tratadas com o óleo essencial de *B. citriodora* por 24h. DOX= composto doxorrubicina ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); ST= sem tratamento.



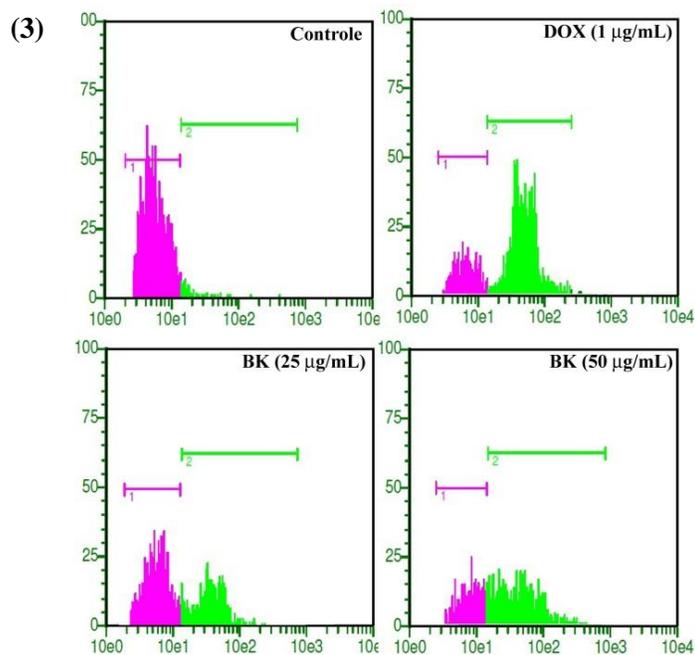


Figura 6 Histogramas referentes aos eventos apoptóticos. (1) A549, (2) HepG2 e (3) HT144. Legenda: picos em rosa= eventos não apoptóticos; picos em verde= células em apoptose.

As imagens obtidas por microscopia de contraste de fase mostraram que o tratamento por 24h com o óleo essencial de BK alterou o padrão morfológico característico das células HepG2 e HT144 (Figura 7). Foi possível observar aumento da população de células arredondadas e perda da aderência ao substrato; alterações indicativas de estresse e morte por apoptose.

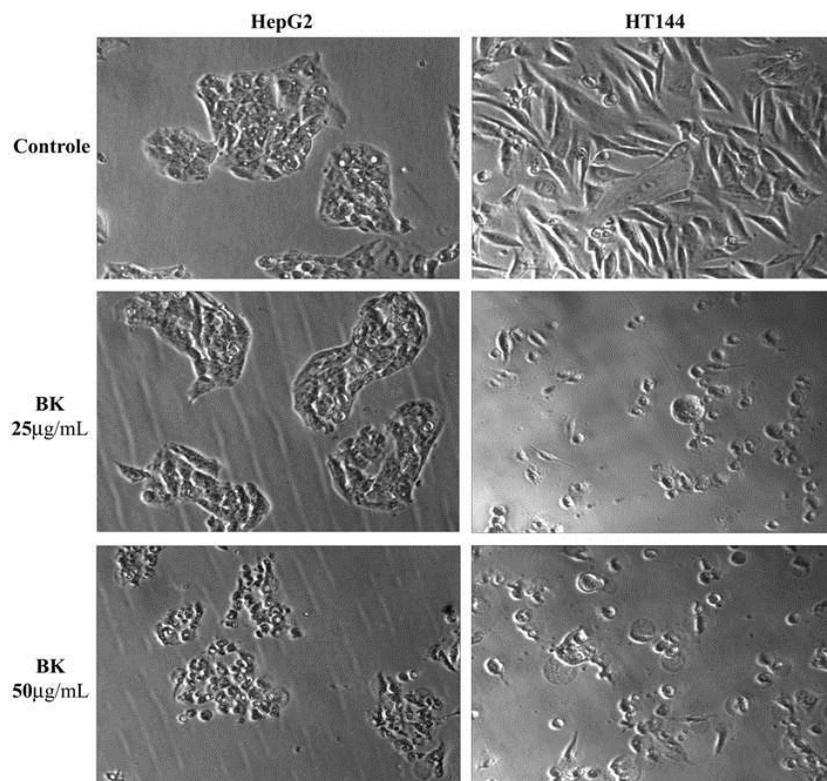


Figura 7 Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando as características morfológicas das linhagens celulares tumorais HepG2 e HT144, após tratamento com o óleo essencial de *B. citriodora*, nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por 24 h.

Os mecanismos de ação relacionados à atividade antitumoral de óleos essenciais têm sido propostos por diferentes autores, evidenciando a participação de vias apoptóticas, parada no ciclo celular e alterações morfológicas, em consequência aos seus efeitos citotóxicos.

Em estudos similares, Chaouki et al. (2009), avaliando a atividade antitumoral do composto citral em culturas de células da linhagem MCF-7 (câncer de mama), constataram que o monoterpene induziu parada no ciclo na fase G2/M, induzindo morte celular por apoptose (22,5 e 36%, nas concentrações de  $10 \times 10^{-5}$  e  $20 \times 10^{-5}$ , respectivamente).

Sinha et al. (2014) investigaram a citotoxicidade e genotoxicidade dos óleos essenciais de palmarosa, lemongrass, citronela e vetiver e dos compostos geraniol e citral. Os autores observaram que as células de linfócitos humanos expostas à ação dessas substâncias, com exceção do geraniol, ocasionaram significativas modificações na atividade mitocondrial, danos no DNA e induziram ao processo de apoptose, quando utilizadas em altas concentrações (200, 400 e 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Contudo, as observações fundamentam a hipótese de que o óleo essencial de *B. citriodora* exerce mecanismos de indução de morte celular, devido ao seu constituinte majoritário, citral.

#### 4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *B. citriodora* apresentou como constituinte majoritário o composto citral (91,19%).

A atividade antioxidante foi mais bem evidenciada pelos métodos TBARS (47,9 a 56,3%) e complexo fosfomolibdênio (0,81  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ácido ascórbico).

O OE apresentou efeito hemolítico perante a metodologia em meio líquido (Ht 0,15%), ocasionando hemólise de 55 e 97%, nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Em meio sólido, o OE mostrou-se hemolítico apenas nas concentrações de 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

O OE apresentou citotoxicidade contra as linhagens tumorais investigadas (A549, HT144 e HepG2); nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , induziu alteração significativa na distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, ocasionando aumento da frequência de apoptose e alterações morfológicas das células, principalmente nas linhagens HT144 e HepG2, com maior potencial citotóxico sobre A549. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados, a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nos potenciais citotóxico e indutor de apoptose do OE de *B. citriodora in vitro* e *in vivo*, o que pode conduzir a uma utilização clínica segura e ampliada.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AFOULOUS, S. et al. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. **Food and Chemical Toxicology**, São Paulo, v. 56, p. 352-362, June 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.

ANTUNES, M. D. C. et al. Effects of posthar-vest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 58, n. 10, p. 6173–6181, May 2010.

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

BOUNATIROU, S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 1, p. 146-155, Jan. 2007.

CHAOUKI, W. et al. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, Paris, v. 23, n. 5, p. 549–556, Oct. 2009.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Communications**, New York, v. 3, n. 7, 207–212, July 1991.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, Aug. 2005.

DARZYNKIEWICZ, Z.; GALKOWSKI, D.; ZHAO, H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. **Methods**, New York, v. 44, n. 3, p. 250-254, Mar. 2008.

DUNCAN, J. S. et al. Regulation of cell proliferation and survival: convergence of protein kinases and caspases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1804, n. 3, p. 505–510, Mar. 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-23, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar. 2007.

GOMES, M. S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Citrus* e de seus componentes majoritários**. 2014. 126 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

GUERREIRO, A. C. et al. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 159, p. 96-102, July 2013.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr./jun. 2011.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 4, p.535-543. Apr. 2002.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOFMANN, J. Resistance to chemotherapy. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 99, n. 8, p. 1368, Oct. 2008.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysics Chemistry**, Philadelphia, v. 83, n. 1, p. 89-100, Jan. 2000.

NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 80-92, 2007.

NHU-TRANG, T.-T.; CASABIANCA, H.; GRENIER-LOUSTALOT, M.-F. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 7, p. 2141-2152, Dec. 2006.

NISHIJIMA, C. M. et al. Citral: a monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 736, p. 16-25, Aug. 2014.

ORTIZ, M. I. et al. Synergistic effect of the interaction between naproxen and citral on inflammation in rats. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 18, n. 1, p. 74–79, Dec. 2010.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, Apr. 2006.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction-A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1808, n. 1, p. 164-170, Jan. 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337–341, May 1999.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SINHA, S. et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 68, p. 71-77, June 2014.

SOBRAL, L. M. et al. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype *in vitro*, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. **Molecular Cancer**, London, v. 13, n. 1, p. 32, Feb. 2014.

SOUTHWELL, I. A. *Backhousia citriodora* F. Muell. (Myrtaceae), A superior source of citral. **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 735-741, Nov./Dec. 2000.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Philadelphia, v. 11, p. 463-471, 1963.

WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T. F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 324, n. 1, p. 224-230, Nov. 2004.

ZANIN, J. L. B. Caesalpinioflavone, a new cytotoxic biflavonoid isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 804-809, 2015.

**ARTIGO 4**

**PROSPECÇÃO DO EFEITO CITOGENOTÓXICO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Backhousia citriodora* EM *Lactuca sativa* L.**

## RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) pertencem ao metabolismo secundário, são constituídos por misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e farmacologicamente ativas. Estudos recentes têm mostrado a importância da realização de ensaios sobre os potenciais farmacológicos e toxicológicos de OEs. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citogenotóxicos do óleo essencial de *Backousia citriodora* no modelo vegetal *Lactuca sativa* L. O OE foi obtido por hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado com duração de 2 horas. A caracterização química foi realizada por cromatografia em fase gasosa – Espectrometria de Massa (CG-MS) e cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC). Sementes de *L. sativa* germinadas, com raízes de 1-2 mm, foram expostas por 48 horas às diferentes concentrações do óleo essencial (5, 25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); como controle negativo, utilizou-se água destilada. Foram realizadas avaliações citogenéticas, teste de TUNEL, eletroforese em gel de agarose e citometria de fluxo. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, composto de 3 repetições. O constituinte majoritário encontrado no óleo essencial foi o citral (91,19%). De modo geral, o OE interferiu na dinâmica normal do ciclo celular (índices mitóticos ou frequência de cada fase em divisão). As células meristemáticas expostas ao óleo apresentaram aumento de alterações cromossômicas clastogênicas, tais como pontes cromossômicas, fragmentos e cromossomos aderentes, e aneugênicas, como segregação tardia e c-metáfases. O teste de TUNEL-positivo evidenciou a ocorrência de fragmentação no DNA. No gel de agarose, não foi observado padrão de DNA *laddering*. A genotoxicidade do OE foi reforçada pela análise de citometria de fluxo, que evidenciou perda de conteúdo de DNA, redução na frequência de células em divisão, aumento da complexidade nuclear e redução no diâmetro do núcleo, em células expostas ao OE de *B. citriodora*. Conclui-se que o OE de *B. citriodora* apresenta efeitos citogenotóxicos, induzindo o processo de morte, sendo fonte promissora para a obtenção de compostos biologicamente ativos.

Palavras-chave: Citral. Ciclo celular. TUNEL. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

Essential oils (EOs) belong to the secondary metabolism, are composed by complex mixtures of volatile, lipophilic and pharmacologically active substances. Recent studies have shown the importance of testing for the pharmacological and toxicological potential of EOs. In this sense, the objective of this study was to evaluate the cytogenotoxic effects of *Backousia citriodora* essential oil in the plant model *Lactuca sativa* L. EO was obtained through hydrodistillation, using a modified Clevenger apparatus, lasting 2 hours. Chemical characterization was performed through gas chromatography - mass spectrometry (GC/MS) and gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). *L. sativa* seeds germinated with 1-2mm roots were exposed for 48 hours to different concentrations of essential oil (5, 25, 50, 100, 200 and 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); as control, distilled water was used. Cytogenetic evaluations were performed, TUNEL test, agarose gel electrophoresis and flow cytometry. The experiments were conducted in a completely randomized design, consisting of three repetitions. The main constituent found in the essential oil was citral (91.19%). In general, the EO interferes with the normal dynamic of the cell cycle (mitotic indexes or frequency of each dividing phase). Meristematic cells exposed to oil increased by clastogenic chromosomal abnormalities such as chromosome bridges, fragments and stickiness chromosomes, and aneugenic activities, as late segregation and c-metaphase. TUNEL-positive test revealed the occurrence of DNA fragmentation. In agarose gel a pattern of DNA laddering was not observed. The OE genotoxicity was reinforced by flow cytometry analysis, which showed loss of DNA content, reduction in the frequency of dividing cells, increased nuclear complexity and reduced core diameter in cells exposed to the EO of *B. citriodora*. We conclude that the EO of *B. citriodora* presents cytogenotoxic effects, inducing the death process, with promising source for obtaining biologically active compounds.

Keywords: Citral. Cell cycle. TUNEL. Flow cytometry.

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais constituem um tipo de metabólito secundário de grande importância econômica. São constituídos, geralmente, por dezenas de moléculas, pertencentes às diferentes classes de compostos, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, ácidos orgânicos, entre outros (BAKKALI et al., 2008).

*Backhousia citriodora*, conhecida como murta-limão, é uma espécie pertencente à família Myrtaceae e nativa da Austrália. Seu óleo essencial é constituído, em maiores proporções, pelo monoterpeneo citral (> 80%) e apresenta distintas atividades biológicas, como antifúngica, antibacteriana, moluscicida e toxicidade sobre linhagens celulares humanas (HAYES; MARKOVIC, 2002; 2003; LAZAR-BAKER et al., 2011).

Atualmente, existem diferentes pesquisas que visam a verificar os efeitos dos produtos naturais nos organismos vivos. A perspectiva do conhecimento dos mecanismos de ação de produtos naturais abre um leque de opção para sua aplicação em diferentes áreas, como, por exemplo, na busca de agrotóxicos alternativos (ARAGÃO et al., 2015) e fitoterápicos (LUBER et al., 2015). Nesse sentido, a avaliação do potencial citogenotóxico, mutagênico, e até mesmo antimutagênico de um produto de origem vegetal, é importante para sua indicação de uso com segurança e eficácia.

Entre as ferramentas disponíveis para acessar os efeitos biológicos de dado produto/composto em organismos vivos, estão os bioensaios com plantas superiores (ANDRADE-VIEIRA, 2012). Eles consistem na avaliação da capacidade do agente testado em causar danos à molécula do DNA ou a estruturas celulares por meio da avaliação de aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo celular normal, em células meristemáticas dos vegetais

utilizados como modelo (ANDRADE-VIEIRA, 2012; LEME; MARIN-MORALES, 2009, GRANT et al., 1994).

O uso de plantas em bioensaios que avaliam a toxicidade de poluentes ambientais, extratos vegetais ou óleos essenciais tem tido grande valor na toxicologia ambiental e alelopatia (LEME; MARIN-MORALES, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ARAGÃO et al., 2015; MIRANDA et al., 2014). Esses ensaios têm sido amplamente utilizados, desde a década de 70, sendo descritos como métodos eficientes para avaliar os danos nas células e no material genético, auxiliando no entendimento da ação de compostos químicos nos organismos vivos (GRANT, 1994, PALMIERI et al., 2014; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, os *endpoints* citogenéticos (alterações do índice mitótico, formação de micronúcleo, anomalias nucleares e aberrações cromossômicas) acessados fornecem dados que permitem alertar a população sobre os agentes potencialmente mutagênicos e teratogênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUSA; VICCINI, 2011).

Entre as vantagens apontadas para o uso de modelos vegetais na prospecção de efeitos biológicos de compostos químicos, destacam-se o baixo custo, confiabilidade e a boa correlação que apresentam com outros modelos e sistemas de teste, como animais (FISKEJÖ, 1985; GRANT et al., 1994). Além disso, são ensaios validados e indicados por agências ambientais, como Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos, e até mesmo organizações, como a Organização Mundial da Saúde (OMS) (GRANT, 1994; GRANT, 1999).

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Backhousia citriodora* no modelo vegetal *Lactuca sativa* L. Trabalhos recentes têm apontado que *L. sativa* é um modelo eficiente para avaliações citogenéticas em estudos de prospecção de atividade citogenotóxica de produtos naturais (ARAGÃO et al., 2015; LUBER et al.,

2015), pois apresenta bom número de sementes, boa superfície de contato com o tratamento, alta sensibilidade para compostos tóxicos e cromossomos grandes (SOUSA; SILVA; VICCINI, 2010; CAMPOS et al., 2008; ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial

A espécie *B.citriodora* foi obtida no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG/Brasil. O material vegetal foi coletado pela manhã, em um dia sem precipitação e foi identificado pela profa. Dra. Mariana Mansanares do Departamento de Biologia (DBI/UFLA).

As folhas sadias foram selecionadas e picadas. Empregou-se a técnica de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, destilando-se por 2h (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010). O hidrolato foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 g por cinco minutos. O óleo essencial obtido foi armazenado em vidro âmbar e mantido sob refrigeração.

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida (J&W Scientific) (5% -fenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm d. i. 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas da análise foram as mesmas utilizadas para CG/DIC. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos s<sup>-1</sup> e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Utilizou-se também, para a identificação dos constituintes, a comparação de seus índices de retenção com os da literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado empregando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963), em relação a uma série homóloga de n-alcanos (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas, NIST107 e NIST21.

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (DIC) Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm d.i, 0,25 µm de filme), usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura foi mantida a 50 °C por 2 min, depois aumentada 4 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 200 °C. Em seguida, aumentada 15 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 300 °C, mantendo-se essa temperatura constante por 15 min; a temperatura do injetor foi 250°C e a temperatura do detector, de 280°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL da diluição do óleo essencial em acetato de etila. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

## **2.2 Análises biológicas**

As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG) e Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF-MG).

As sementes de alface do tipo crespa (cultivar: Verônica) foram cultivadas sob ambiente protegido, na região de Lavras (MG) e foram doadas para a realização das análises.

### **2.2.1 Exposição do material biológico ao óleo essencial**

As sementes de *L. sativa* (50 unidades) foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, sobre papel de filtro previamente umedecido com 3 mL de água destilada. As placas foram mantidas em uma câmara de germinação (BOD) a 24 ± 2 ° C, sem luz, durante 16h para estímulo da

germinação. Após esse período, sementes germinadas com raízes de 1-2mm, foram tratadas com as soluções do óleo essencial, em diferentes concentrações (5, 25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A água destilada foi utilizada como tratamento-controle. As placas foram novamente incubadas e mantidas em BOD durante o período de 48h. Posteriormente, as raízes foram cortadas e fixadas em etanol: ácido acético (3:1), por um período mínimo de 24h.

### **2.2.2 Análises citogenéticas**

Para preparo das lâminas para avaliação de toxicidade, as raízes fixadas foram lavadas e hidrolisadas em HCl 1N a 60°C por 10 minutos. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética 2%. Cada lâmina foi preparada com 2 meristemas tratados, sendo avaliadas 5 lâminas por tratamento. Para cada lâmina, foram avaliadas 1000 células, totalizando 5000 células meristemáticas observadas para cada tratamento. Os seguintes parâmetros foram anotados: índice mitótico (IM), porcentagem de alterações nucleares (condensação, núcleo lobado), alterações cromossômicas aneugênicas (cromossomos não orientados, c-metáfases, cromossomos pegajosos, anáfases multipolares) e clastogênicas (pontes, fragmentos, micronúcleos) (PALMIERI et al., 2014).

### **2.2.3 Análise de citometria de fluxo**

O meristema das amostras foi triturado, em placa de Petri, contendo 1 mL do tampão de extração LB01 gelado (DOLEZEL, 1997). A suspensão nuclear obtida foi aspirada com auxílio de uma pipeta de plástico, filtrada e, posteriormente, coletada em um tudo de poliestireno. Adicionaram-se à suspensão 25 $\mu\text{L}$  de uma solução de iodeto de propídeo (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) e 2,5  $\mu\text{L}$  de

RNase. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados. A análise foi realizada em citômetro FACS Calibur (BD). Os histogramas foram obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI. Foi estimado o conteúdo de DNA nuclear nas fases sub-G1, G1, S e G2 e avaliados os parâmetros IF<sup>a</sup>G1 (*fluorescence intensity G1 peak*), FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*).

#### **2.2.4 Extração do material genético e avaliação de danos**

As raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído com tampão CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio) a 65°C. As proteínas foram removidas com solução de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 24:1. O DNA foi precipitado em álcool isopropílico e ressuspenso com 10 µL de água destilada.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,2%), com adição de 5 µL de brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) em 100 mL de tampão Tris/borato/EDTA (TBE 1X). Foram adicionadas às amostras 2 µL do tampão “Blue/Orange loading” (Promega), que foram comparadas com o padrão “100 bbp DNA ladder” (Promega). A corrida eletroforética foi realizada durante 40 minutos e voltagem de 80V (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

#### **2.2.5 Teste TUNEL**

As raízes fixadas em Carnoy, tratadas com 500 µg mL<sup>-1</sup> de óleo e água, foram lavadas em PBS 1X e TNT 1X e submetidas ao teste de TUNEL, conforme instruções do fabricante (Promega) para o kit DeadEnd™

Fluorometric TUNEL System Technical Bulletins (PROMEGA, 2009). A reação positiva foi marcada com fluoresceína e DAPI.

A ocorrência de células TUNEL positivo foi anotada, avaliando as lâminas obtidas em microscópio epifluorescente (Olympus BX60) no comprimento de onda de 355-375 nm para o DAPI e 460-490 nm, para evidenciar as células TUNEL-positivas com fluoresceína.

### **2.2.6 Análise estatística**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente ao acaso, composto de três repetições. Utilizou-se o *software* livre “R” (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) empregando os testes de médias de Tukey para avaliação das alterações cromossômicas e teste de Kruskal-Wallis para as demais análises ( $p > 0.05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises cromatográficas permitiram identificar e quantificar no óleo essencial de *B. citriodora* o constituinte majoritário citral, constituído pela mistura dos aldeídos isoméricos geranial e neral, nas proporções de 39,82% e 51,37%, respectivamente (Figura 1).

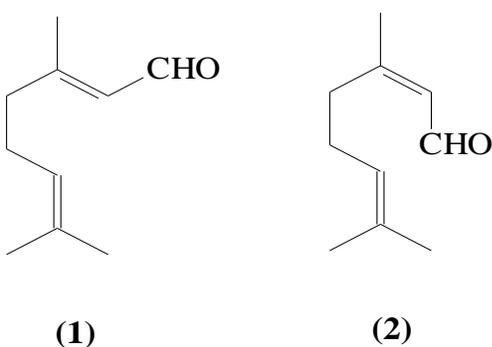


Figura 1 Estruturas químicas dos compostos geranial (1) e neral (2).

A Figura 2 apresenta os diferentes valores do índice mitótico e alterações cromossômicas observadas nos meristemas de *L. sativa* expostos ao óleo essencial de *B. citriodora*. Observou-se que o óleo ocasionou um aumento significativo do índice mitótico, nas concentrações de 25, 50, 100 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não havendo diferença significativa nas concentrações de 5 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , quando comparadas ao controle.

O índice mitótico corresponde ao número total de células em divisão durante o ciclo celular, e qualquer alteração nesse índice auxilia na determinação do grau de citotoxicidade de um agente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). A redução do índice mitótico pode estar relacionada a distúrbios causados no crescimento e desenvolvimento do organismo exposto,

enquanto o aumento representa um acréscimo na divisão celular, induzindo uma desordem na proliferação das células (CAMPOS et al., 2008). Além disso, as variações nas frequências do IM podem estar relacionadas com a frequência de cada fase em divisão e com as alterações ao longo do ciclo mitótico decorrentes da exposição ao óleo essencial, como observado por Aragão et al. (2015).

A frequência de células com aberrações cromossômicas, dentro do total de células avaliadas, aumentou significativamente nas concentrações de 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , quando comparadas ao controle (Figura 1).

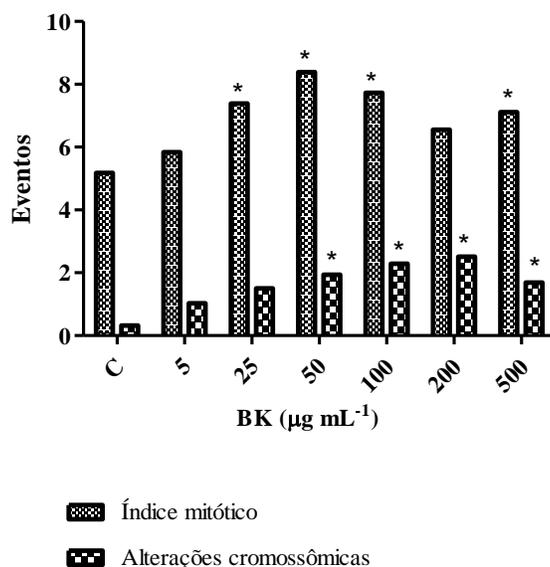


Figura 2 Índice mitótico e alterações cromossômicas ocasionadas pela presença do óleo essencial de *Bachkousia citriodora* (BK). \*Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

A presença de pontes e fragmentos sugere a ação clastogênica (LEME; MARIN-MORALES, 2009) do óleo essencial de *B. citriodora*, a qual está relacionada a alterações estruturais decorrentes de quebras na molécula de DNA.

A quebra cromossômica induzida pelo agente clastogênico leva à

observação de fragmentos cromossômicos acêntricos. Os cromossomos que sofreram quebras perdem o telômero e, conseqüentemente, sua estabilidade. Esses cromossomos instáveis, sem telômeros, tendem a fundir a outros cromossomos, gerando cromossomos dicêntricos (CAMPOS et al., 2008). Na ocasião da anáfase, o centrômero de cada cromossomo é ligado ao fuso de um dos polos da célula, a cromátide entre os centrômeros é vista como uma ponte entre os dois polos anáfasicos.

Os fragmentos cromossômicos acêntricos, como os observados, podem ser envoltos por uma membrana e originar micronúcleos. Os micronúcleos representam material genético que não foi incorporado ao núcleo principal no final da divisão celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; CAMPOS et al., 2008). Eles são formados tanto por fragmentos acêntricos, como por cromossomos perdidos, derivados da segregação desigual dos cromossomos durante a mitose, por problemas na ligação dos cromossomos ao fuso mitótico (CAMPOS et al., 2008; LEME, MARIN-MORALES, 2009).

A migração tardia pode levar à perda de cromossomos, assim como c-metáfases, que foram observadas nos tratamentos com o óleo essencial de *B. citriodora* (Tabela 1). Tais tipos de alterações indicam mecanismo de ação aneugênicos, sugerindo que o óleo testado apresentou efeitos sobre a polimerização e despolimerização das fibras do fuso mitótico, impedindo a ligação dos microtúbulos do fuso mitótico na região centromérica dos cromossomos, comprometendo a continuidade do ciclo celular (CAMPOS et al., 2008 LEME; MARIN-MORALES, 2009).

De acordo com Aragão et al. (2015), os monoterpenos presentes no óleo essencial de *E. grandis* atuam como agentes aneugênicos. Já os monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados, como citral,  $\beta$ -citronelal, geraniol, elemol e cadinol presentes no óleo de *E.*

*citriodora* e ausentes em *E. grandis*, atuaram tanto como agentes clastogênicos e aneugênicos, efeitos observados para o óleo essencial de *B. citriodora* (rico em citral).

Tabela 1 Alterações das células em divisão tratadas com o óleo essencial de *B. citriodora*.

Tratamentos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fragmento	Migração tardia	Ponte	Cromossomos aderentes	Cmetáfases
Controle	2,21 $\pm$ 2,32	1,14 $\pm$ 1,56	0,00 $\pm$ 0,00	1,96 $\pm$ 2,73	0,39 $\pm$ 0,88
5	1,02 $\pm$ 1,60	0,53 $\pm$ 0,73	5,40 $\pm$ 5,54*	4,56 $\pm$ 4,66	1,26 $\pm$ 1,11
25	2,73 $\pm$ 1,91	0,22 $\pm$ 0,50	2,11 $\pm$ 2,59	7,71 $\pm$ 2,96*	3,70 $\pm$ 1,42*
50	4,32 $\pm$ 2,89	2,68 $\pm$ 2,98	1,28 $\pm$ 1,38	8,96 $\pm$ 3,00*	1,48 $\pm$ 1,60
100	3,68 $\pm$ 2,68	3,75 $\pm$ 2,73*	3,24 $\pm$ 2,16*	8,29 $\pm$ 7,01*	4,72 $\pm$ 2,90*
200	6,86 $\pm$ 4,92*	2,11 $\pm$ 2,17	4,15 $\pm$ 1,16*	9,65 $\pm$ 6,11*	5,71 $\pm$ 2,97*
500	2,33 $\pm$ 2,21	1,91 $\pm$ 0,89	1,65 $\pm$ 1,76	8,10 $\pm$ 3,19*	5,41 $\pm$ 3,08*

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

\*Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

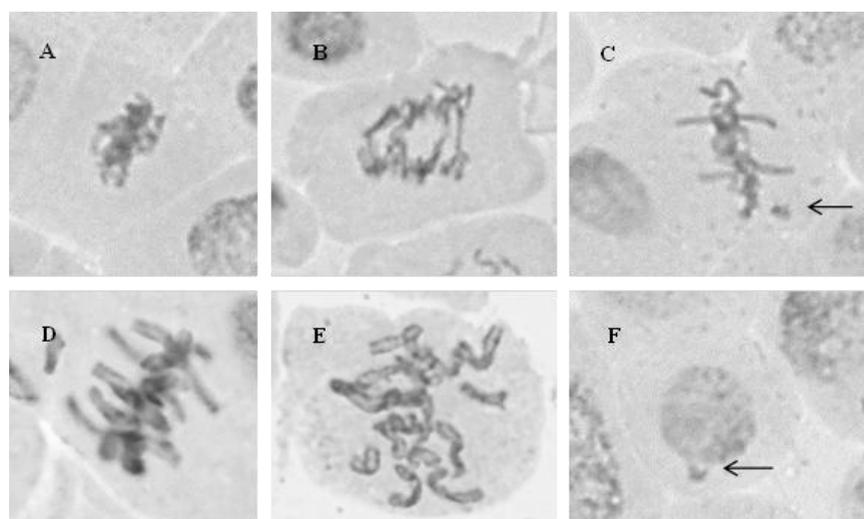


Figura 3 Aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *L. sativa* expostas ao óleo essencial de *B. citriodora*. A) Cromossomo aderente; B) Ponte; C) Formação de fragmentos; D) Migração tardia; E) C-metáfase; F) Micronúcleo.

As análises de citometria de fluxo demonstraram que a exposição ao óleo essencial de *B. citriodora* alterou de forma dose-dependente os parâmetros acessados (Tabela 2). Foi observado um aumento significativo na frequência de partículas nucleares na fase subG1, redução do número de células em S/G2 em detrimento do aumento na frequência de células em G1, para os tratamentos com o óleo essencial nas concentrações de 100, 200 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A redução da frequência de células em S/G2 demonstra um efeito mitodepressivo sobre a divisão celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Como consequência da redução na frequência de células em divisão, ocorre um aumento da população de células em G1 que não irão se dividir (Tabela 2). Além disso, o aumento de partículas sub-G1 demonstra a ocorrência de núcleos que apresentam quantidade de DNA menor do que o esperado (G1), corroborando com a observação de fragmentos e migração tardia observados na análise citogenética.

As maiores concentrações de óleo de *B. citriodora* testadas (de 100, 200 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) também reduziram significativamente o parâmetro  $\text{IF}^{\text{aG1}}$ , relacionado à emissão de fluorescência nas partículas “lidas” pelo citômetro e à quantidade de DNA na fase G1 do ciclo celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Tal fato está relacionado à fragmentação do material genético, como mostrado em subG1. Para SSC, foi possível observar um aumento na granulosidade e/ou complexidade nuclear com o tratamento com o óleo essencial de *B. citriodora*, o que pode ser relacionado ao aumento de irregularidades no material genético e de proteínas histonas agregadas ao DNA, necessárias para condensá-lo.

A análise do padrão FSC demonstrou que, com exceção da concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , todos os demais tratamentos do óleo essencial ocasionaram uma redução do volume nuclear, corroborando os resultados obtidos nas análises já

descritas. Esses dados evidenciam a ocorrência de morte celular, a qual, segundo Andrade-Vieira et al. (2011), é caracterizada pela condensação nuclear e fragmentação do material genético.

Tabela 2 Análise de citometria de fluxo do meristema de *L. sativa* após tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial de *B. citriodora*.

Tratamentos ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	SubG1	G1	SG2	IF <sup>a</sup> G1	FSC	SSC
Controle	8,40±0,46	54,78±2,70	36,82±2,99	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
5	8,86±0,31	56,38±2,74	34,76±2,44	99,53±0,82	98,94±1,07	99,61±1,80
25	7,55±0,90	56,16±1,81	36,29±2,67	99,48±1,38	97,90±0,88*	99,98±0,20
50	8,52±0,33	53,44±4,04	38,04±4,35	99,34±3,39	96,55±0,79*	101,95±1,75
100	10,34±0,23*	59,30±1,06*	30,40±1,28*	95,67±1,11*	90,81±0,45*	106,74±0,90*
200	17,12±2,27*	58,71±4,84*	24,17±5,72*	89,71±0,72*	88,00±0,67*	108,27±2,34*
500	22,37±4,46*	66,86±1,06*	10,77±4,12*	86,42±2,32*	83,45±1,11*	115,28±2,26*

**IF<sup>a</sup>G1**= Intensidade de fluorescência do pico G1; **FSC**= Condensação nuclear; sombra frontal do núcleo;  
**SSC**= Complexidade nuclear.

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão.

\*Diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Nesse sentido, o ensaio de TUNEL (sigla para Terminal d-UTP Nick End Labeling, da definição do teste em inglês) foi realizado em conjunto com a análise da integridade do DNA genômico, via eletroforese, para confirmar a ocorrência de fragmentação como marcador de morte celular. O teste de TUNEL tem por objetivo marcar as regiões de DNA com 3'-OH livre em função da fragmentação do DNA, sendo um teste confiável para a detecção de células em processo de morte celular (BEHBOODI; SAMADI, 2004; ANDRADE-VIERA et al., 2011). A enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) presente na reação de TUNEL transfere nucleotídeos d-UTPs marcados com fluoresceína para as extremidades 3'-OH livres que foram cortadas (BEHBOODI; SAMADI, 2004). Logo, a presença de células TUNEL-positiva com núcleos, que fluorescem no comprimento de onda (correspondente à coloração verde) no material avaliado, representam as células em processo de morte. No presente trabalho, foram observados células TUNEL-positivo para o tratamento de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de óleo de *B. citriodora* (Figura 4). Além de células em intérfase, células em mitose (núcleos profásicos e metafásicos) também foram observados com marcação positiva no teste TUNEL (Figura 4D; 4E).

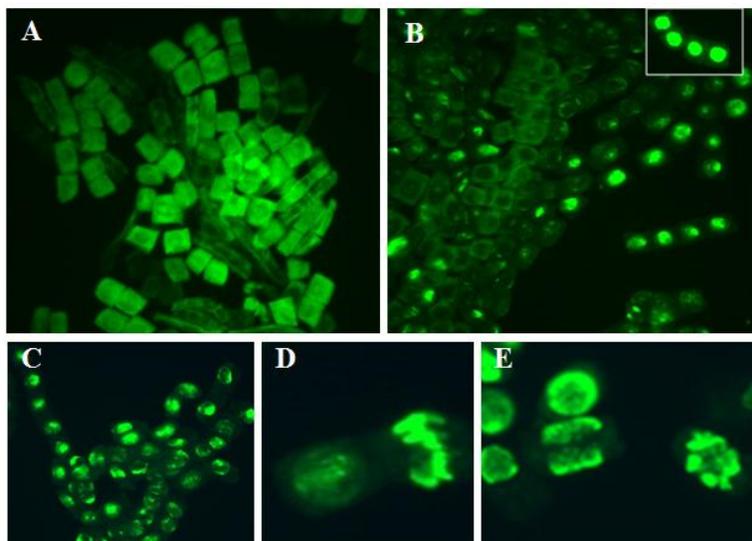


Figura 4 Teste TUNEL após tratamento com o óleo essencial de *B. citriodora* ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A) Controle (água). B-C) Teste positivo. D-E) Resultado positivo para células em diferentes fases do ciclo celular.

Outro critério molecular que também evidencia a morte celular é a produção de fragmentos oligonucleossômicos de DNA, originados pela quebra de enzimas endonucleases, ativadas por compostos genotóxicos. A clivagem do DNA pelas endonucleases de restrição ocorrem, gerando segmentos de DNA de 200pb ou múltiplos (KATSUHARA; KAWASAKI, 1996), os quais podem ser separados utilizando-se eletroforese em gel de agarose (DOORN; WOULTERING, 2005; 2010), originando um padrão do gel denominado DNA *laddering* (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011). Embora a morte celular tenha sido demonstrada nas outras análises, o padrão de DNA *laddering* não foi observado no gel de agarose, nem mesmo fragmentação aleatória no genoma de *L. sativa* exposto ao óleo essencial de *B. citriodora* (Figura 5). Assim, sugere-se que a fragmentação do DNA observada apenas no teste de TUNEL foi aleatória, e que os fragmentos gerados foram muito pequenos e em quantidade não significativa,

o que torna difícil a visualização e identificação de arraste no gel. Não obstante, os resultados obtidos com os outros testes reforçam a genotoxicidade do óleo essencial e indução de morte celular.

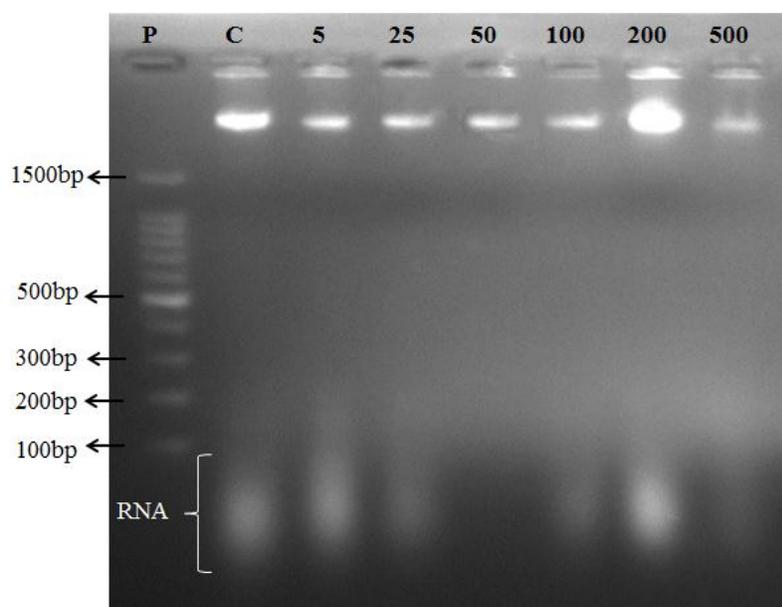


Figura 5 Gel de eletroforese para avaliação da fragmentação do material genético. P= padrão de DNA; C= controle.

Miranda et al. (2015) avaliaram o efeito biológico dos óleos essenciais extraídos de folhas de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e dos compostos citral, eugenol e cineol sobre a germinação e vigor de aquênios de alface. Esses autores observaram que os óleos essenciais de capim-limão e alfavaca apresentaram potenciais alelopáticos que podem ser atribuídos aos conteúdos dos respectivos constituintes majoritários, citral e eugenol, indicando, assim, uma possível atividade para o óleo essencial de *B. citriodora* estudado no presente trabalho. Já o efeito alelopático do óleo essencial de manjericão é consequência do efeito conjunto de todos os componentes.

Estudos de Miranda et al. (2014) afirmam que os óleos essenciais ricos em monoterpenos afetam a germinação e crescimento de plantas, por causarem modificações morfológicas e fisiológicas nos vegetais, como as inibições da cadeia respiratória da matriz mitocondrial isolada, alteração da integridade das membranas das células, deterioração das ceras cuticulares, aumento da transpiração, peroxidação lipídica, danos aos microtúbulos e inibição da mitose. Esses últimos efeitos de compostos monoterpênicos em plantas estão relacionados à progressão da divisão celular e a alterações, acessadas como *endpoints* de ensaios de citogenotoxicidade com modelos vegetais.

Estudos realizados por Granã et al. (2013), avaliando o efeito do citral no desenvolvimento de raízes de *Arabidopsis thaliana*, observaram alterações na divisão celular, espessamento na parede celular e reduções na comunicação intercelular, confirmando a fitotoxicidade do composto. De acordo com Chaimovitch et al. (2012), a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas são inibidos na presença de citral, ocasionando danos nos microtúbulos tanto em células vegetais quanto animais em intérfase. Assim, pode-se atribuir os efeitos citogenotóxicos do óleo essencial de *B. citriodora*, descritos no presente estudo, ao seu constituinte majoritário citral.

Com base nas informações obtidas neste trabalho e nas pesquisas realizadas por Andrade, Davide e Gedraite (2010), Andrade-Vieira et al. (2014), Aragão et al. (2015), Palmieri et al. (2014) e Sousa e Viccini (2011), verifica-se que os testes com *L. sativa* permitem detectar os efeitos genotóxicos e mutagênicos presentes em poluentes, extratos e óleos essenciais. Além disso, é possível avaliar vários parâmetros genéticos e os mecanismos de ação dos agentes testados sobre o DNA do organismo exposto. Esses ensaios fornecem importantes informações para a seleção de agentes mutagênicos e seus resultados podem ser usados como proposições para outros sistemas teste.

#### **4 CONCLUSÃO**

O óleo essencial de *B. citriodora*, tendo o citral como composto majoritário (>90%), apresentou efeito sobre células meristemáticas de *L. sativa*, demonstrando efeitos clastogênicos e aneugênicos.

O óleo induziu alterações no ciclo celular e no conteúdo de DNA, além de ativar a morte celular das células expostas.

O óleo essencial da espécie *B. citriodora* apresentou efeitos citogenotóxicos, constituindo-se promissora fonte para a prospecção de compostos biologicamente ativos.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4<sup>th</sup> ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 4, p. 626-631, May 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 373-382, Mar. 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, London, v. 107, p. 140146, Sept. 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 4, p. 822-828, May 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxicity of landfills assessed by plant cytogenetic approaches. In: CABRAL, G. B. C.; BOTELHO, B. A. E. (Ed.). **Landfills: waste management, regional practices, and environmental impact**. 1. ed. New York: Nova Science, 2012. v. 1, p. 319-330.

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.) **Allelopathy Journal**, New York, v. 35, n. 2, p. 259-272, Jan. 2015.

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

BEHBOODI, B. S.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**, Limerick, v. 167, n. 3, p. 411-416, Sept. 2004.

CAMPOS, J. M. S. et al. Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions. In: \_\_\_\_\_. **Plant bioassays**. Houston: Studium, 2008. 344 p.

CHAIMOVITSH, D. et al. The relative effect of citral on mitotic microtubules in wheat roots and BY2 cells. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 14, n. 2, p. 354-364, Mar. 2012.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Warsal, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOORN, W. G. V.; WOULTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 117-122, Mar. 2005.

DOORN, W. G. V.; WOULTERING, E. J. What about the role of autophagy in PCD? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 361-362, July 2010.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 88, n. 3, p. 252-259, July 2007.

FISKEJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, Mar. 1985.

GRANĀ, E. et al. Citral induces auxin and ethylene-mediated malformations and arrests cell division in *Arabidopsis thaliana* roots. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 39, n. 2, p. 271-282, Feb. 2013.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations - a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, May 1999.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, Oct. 1994.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 4, p.535-543, Apr. 2002.

HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 2. Absorption and histopathology following application to human skin. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 1409-1416, Oct. 2003.

KATSUHARA, M., KAWASAKI, T. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley root. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 37, n. 2, p. 169-173, 1996.

LAZAR-BAKER, E. E. et al. Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) honey. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 227-232, Mar. 2011.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, July/Aug. 2009.

LUBER, J. et al. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 2, p. 903-913, abr./jun. 2015.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 36, n. 3, supl. 1, p. 1783-1798, 2015.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Chemical composition and allelopathic activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* weeds essential oils. **American Journal of Plant Sciences**, Delaware, v. 5, n. 9, p. 1248-1257, Apr. 2014.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: a comparative approach. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 15, n. 763, p. 30–35, Mar. 2014.

PROMEGA CORPORATION. DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System Technical Bulletins. **Instructions for use of product G3250**. 2009. p. 1-21. Disponível em: <[www.promega.com.br/resources/protocols/technical-bulletins/0/deadend-fluorometric-tunel-system-protocol/](http://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-bulletins/0/deadend-fluorometric-tunel-system-protocol/)>. Acesso em: 10 ago. 2015.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011.

SOUSA, S. M.; SILVA, P. S.; VICCINI, L. F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 305-311, jan./jun. 2010.

SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 98-104, jan./fev. 2011.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Philadelphia, v. 11, p. 463-471, 1963.

**ARTIGO 5**

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia*, *M. quinquenervia* E *Backhousia citriodora* NA SÍNTESE DE OCRA TOXINA A POR *Aspergillus niger* E *A. carbonarius* isolados DE UVAS VINÍFERAS TROPICAIS**

## RESUMO

Atualmente, o desenvolvimento de fungos em alimentos e a subsequente contaminação desses por micotoxinas constituem um problema de saúde pública. Uma alternativa para reduzir a contaminação dos alimentos por ocratoxina A (OTA) é a utilização de óleos essenciais (OEs). O objetivo desta pesquisa foi estudar a influência dos OEs extraídos das folhas de *Melaleuca alternifolia*, *M. quinquenervia* e *Backhousia citriodora* sobre a síntese de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*. A extração dos OEs foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado com duração de 2 horas, sendo posteriormente, analisados por GC/EM e GC-DIC. O potencial toxigênico dos óleos (31,25; 15,62 e 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi avaliado por meio da inibição da produção de OTA pelos fungos *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* em meio de cultura ágar Czapeck. A quantificação da toxina foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência e separação por coluna C18. Os constituintes majoritários encontrados no OE de *M. alternifolia* foram  $\gamma$ -terpineno (19,30%) e terpinen-4-ol (56,80%). O OE de *M. quinquenervia* apresentou como constituintes majoritários os compostos  $\alpha$ -pineno (61,37%) e linalol (22,08%). No OE de *B. citriodora*, foi encontrado o citral (91,19%) como constituinte principal. Foram observadas diferenças no nível de produção de OTA, dependentes da espécie fúngica, da temperatura de incubação (15 e 25°C) e da presença dos óleos essenciais. Nos ensaios realizados a 15°C, verificou-se que os óleos propiciaram redução de OTA variando de 56,70 a 76,93% e de 54,78 a 98,68%, para as espécies fúngicas *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. A 25°C, as reduções variaram de 38,66 a 75,93% e de 17,94 a 71,79% para os respectivos fungos. Dessa forma, é necessária a realização de ensaios *in vivo* utilizando-se os óleos essenciais nos produtos alimentícios, susceptíveis à contaminação por fungos produtores de OTA, para confirmar a eficiência desses óleos.

Palavras-chave: Produtos naturais. Fungi. Micotoxinas.

## ABSTRACT

Currently, the development of fungi in food and subsequent mycotoxin contamination from these constitutes a major public health problem. An alternative to reduce food contamination by ochratoxin A (OTA) is the use of essential oils (EOs). The objective of this research was to study the influence of EOs extracted from the leaves of *Melaleuca alternifolia*, *M. quinquenervia* and *Backhousia citriodora* on OTA synthesis by *Aspergillus niger* and *A. carbonarius*. The EO extraction was performed through hydrodistillation method, using a modified Clevenger apparatus, lasting 2 hours, then analyzed by GC/MS and GC-FID. The toxigenic activity of essential oils (31.25; 15.62 and 7.81 mg L<sup>-1</sup>) was evaluated by inhibiting the production of OTA by *Aspergillus niger* and *A. carbonarius* in Czapeck agar medium. The quantification of the toxin was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection and separation by C18 column. The major constituents found in *M. alternifolia* EO were  $\gamma$ -terpinene (19.30%) and terpinen-4-ol (56.80%). The *M. quinquenervia* EO presented as major compound constituents  $\alpha$ -pinene (61.37%) and linalool (22.08%). In the EO of *B. citriodora* citral was found (91.19%) as the main constituent. There were differences in OTA production level, depending on the fungal species, the incubation temperature (15 and 25°C) and the presence of the essential oils. In tests carried out at 15°C, it was found that the oils have led OTA reduction ranging from 56.70 to 76.93% and from 54.78 to 98.68% for the fungal species *A. niger* and *A. carbonarius*, respectively. At 25°C, reductions ranged from 38.66 to 75.93% and from 17.94% to 71.79% for the respective fungi. Thus, it is necessary to carry out in vivo assays using essential oils in food products susceptible to contamination by OTA producing fungi to confirm the effectiveness of these oils.

Keywords: Natural products. Fungi. Mycotoxins.

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são metabólitos secundários obtidos das plantas, constituídos principalmente de mono, sesquiterpenos e fenilpropanoides, compostos que conferem suas características organolépticas. Possuem grande aplicação na perfumaria, em cosméticos e alimentos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O óleo essencial obtido da planta *Melaleuca alternifolia*, espécie nativa da Austrália, é empregado, em grande parte, devido às suas propriedades antimicrobianas, sendo incorporado como ingrediente ativo em muitas formulações tópicas utilizadas para o tratamento de infecções cutâneas (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Myrtaceae) apresenta ampla variação na constituição química do seu óleo essencial (diferentes quimiotipos), sendo descritos como constituintes majoritários *E*-nerolidol e viridifloral, indicando, assim, distintas potencialidades biológicas (PADOVAN et al., 2010).

A espécie *Backhousia citriodora*, conhecida como murtão-limão, apresenta propriedades antifúngicas, que podem ser decorrentes da ação do citral, constituinte majoritário do óleo essencial (80-98%) (LAZAR-BAKER et al., 2011).

Os fungos, durante o seu ciclo de vida, conseguem metabolizar e sintetizar uma série de compostos orgânicos com caráter maléfico. O elevado índice de contaminação dos alimentos por esses micro-organismos tem gerado perdas significativas à indústria, pois além da deterioração, esses micro-organismos produzem micotoxinas.

*Aspergillus carbonarius* e *A.niger* podem produzir, por meio do seu metabolismo secundário, a ocratoxina A (OTA), uma micotoxina que tem sido detectada em vários tipos de alimentos, tais como cereais, café, feijão, frutas secas, uvas, vinhos e produtos derivados desses; possui efeitos nefrotóxicos, cancerígenos, imunotóxicos, teratogênicos e genotóxicos nos animais testados (GARCIA et al., 2011). Entre os fatores abióticos, a temperatura pode afetar o crescimento e a produção da OTA pelo fungo. Esses organismos requerem temperatura ótima para o seu crescimento, que pode distinguir da temperatura para a produção da toxina (MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011).

Assim, a exploração da atividade biológica dos óleos essenciais pode constituir uma forma alternativa no controle de micro-organismos, visando a minimizar os efeitos adversos dos aditivos sintéticos utilizados como conservantes nos alimentos.

O objetivo neste trabalho foi avaliar os efeitos dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. quinquenervia* e *B. citriodora* na síntese de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger* em duas condições distintas de incubação, a 15 e 25°C.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Extração e composição química dos óleos essenciais

As plantas *M. alternifolia* e *M. quinquenervia* foram coletadas na Fazenda Guapiara, município de Aiuroca-MG/Brasil. A espécie *B.citriodora* foi obtida no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG/Brasil. O material vegetal foi coletado pela manhã, em um dia sem precipitação.

As folhas sadias foram selecionadas e picadas. Empregou-se a técnica de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, destilando-se por 2 horas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA, 2010). O hidrolato foi centrifugado a 965,36 g por cinco minutos. Os óleos essenciais obtidos foram armazenados em vidro âmbar e mantido sob refrigeração.

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

As análises quantitativas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamas (DIC) Shimadzu GC-17A, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5% dimetilpolisiloxano) com 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura foi mantida a 50 °C por 2 min, depois aumentada 4 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 200 °C. Em seguida, aumentada 15 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 300 °C, mantendo-se essa temperatura constante por 15 min; a temperatura do injetor foi 250°C e a temperatura do detector, de 280°C. Foi injetado um volume de 0,5 µL da diluição do óleo essencial em acetato de etila.

A análise qualitativa foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG/EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida (J&W Scientific) (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm d. i. 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. As condições cromatográficas da análise foram as mesmas utilizadas para CG/DIC. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos s<sup>-1</sup> e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Utilizou-se também, para a identificação dos constituintes, a comparação de seus índices de retenção com os da literatura. O índice de retenção foi calculado empregando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963), em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC<sub>9</sub>-nC<sub>18</sub>). Também foram utilizadas duas bibliotecas, NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas.

## 2.2 Atividade dos óleos essenciais na síntese de ocratoxina A

O efeito ocratoxigênico dos óleos essenciais foi avaliado pelo método descrito por Wang et al. (2012), por meio da inibição da produção de ocratoxina A por fungos *A. carbonarius* (CCDCA110) e *A. niger* (CCDCA101) em meio de cultura. Para a obtenção do inóculo, os isolados fúngicos, obtidos do acervo da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA), foram transferidos para placas contendo o meio de cultura ágar Czapeck e incubados a 25°C por 7 dias. Após esse período, preparou-se a suspensão de esporos em água destilada estéril contendo 0,5% de Tween 80. A câmara de Neubauer foi utilizada para a determinação da concentração final de esporos (10<sup>7</sup> esporos mL<sup>-1</sup>).

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL da suspensão de esporos no centro da placa contendo o meio Agar Czapeck (CYA) adicionado de diferentes concentrações dos óleos essenciais diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Utilizaram-se os controles (fungo e fungo + DMSO) e três concentrações dos óleos (31,25; 15,62 e 7,81 µg mL<sup>-1</sup>), sendo duas abaixo da concentração mínima inibitória (CMI), determinada em testes preliminares. As placas foram incubadas em BOD a 15 e 25 °C, no escuro, por 10 dias.

### **2.2.1 Extração da OTA das culturas fúngicas**

A ocratoxina A foi extraída de acordo com o método de Passamani et al. (2014). Inicialmente, três plugs da colônia foram removidos da área interna, meio e borda de cada colônia no décimo dia do período de incubação. Esses plugs foram pesados e depositados em tubos de ensaio envolvidos por papel-alumínio, com posterior adição de metanol (1 mL). Os tubos foram agitados vigorosamente por 5 segundos e mantidos à temperatura ambiente por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (politetrafluoretileno) (0,22 µm) (Millipore) e, então, analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20A injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5mm, 5µm). Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado das amostras e do padrão foi de

20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol: acetonitrila: água: ácido acético).

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio de padronização externa. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas:  $LD = 3DP/m$  e  $LQ = 10DP/m$  (em que, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata. Utilizou-se o teste Scott-Knott., ao nível de 5% de significância, para avaliar a diferença da redução de OTA entre os ensaios (FERREIRA et al., 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ocratoxina A por *A. carbonarius* e *A. niger*, avaliados nas temperaturas de 15 e 25°C, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Efeito de óleos essenciais (%) na redução da síntese de OTA.

	Tratamentos	Fungos			
		<i>A. carbonarius</i>		<i>A. niger</i>	
		15°C	25°C	15°C	25°C
	<b>DMSO</b>	<b>12,99</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<i>M. alternifolia</i>	<b>7,81</b>	70,23a	38,66a	97,68a	56,41b
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>15,62</b>	57,60a	61,05a	54,78a	17,94e
	<b>31,25</b>	73,83a	75,93a	84,16a	71,79a
<i>M. quinquenervia</i>	<b>7,81</b>	68,12a	59,95a	83,16a	0,00 f
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>15,62</b>	66,80a	57,22a	92,41a	35,89c
	<b>31,25</b>	60,32a	55,93a	83,49a	25,64d
<i>B. citriodora</i>	<b>7,81</b>	68,16a	59,67a	89,43a	0,00 f
( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>15,62</b>	76,93a	73,20a	87,79a	0,00 f
	<b>31,25</b>	68,57a	71,53a	98,68a	15,38e

Valores de redução (%) calculados considerando-se o controle fúngico como 100%. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Foi observado que a temperatura de 25°C propiciou uma maior diminuição na produção de OTA para ambos os fungos. Houve redução de, aproximadamente, 8,77 (15°C) a 2,09  $\mu\text{g g}^{-1}$  (25°C) e de 0,300 (15°C) a 0,039  $\mu\text{g g}^{-1}$  (25°C), para os fungos *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. Geralmente, a produção de OTA por *A. carbonarius* é maior do que *A. niger*, o que é justificado pelo comportamento específico dos isolados testados.

Segundo Magan, Medina e Aldred (2011), os fatores mais importantes que influenciam o crescimento, a esporulação e a produção da toxina pelo fungo são temperatura e atividade de água. Passamani et al. (2014), avaliando o efeito

de fatores abióticos na produção de OTA, observaram maiores concentrações de toxina para *A. carbonarius* e *A. niger* (10 e 7,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente) em condições de stress, a 15°C, ocorrendo níveis reduzidos a 25°C, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

Pelos dados apresentados na Tabela 1, verificou-se que os OEs, nos ensaios realizados a 15°C, propiciaram redução de OTA variando de 56,70 a 76,93% e de 54,78 a 98,68%, para as espécies fúngicas *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. Ao passo que, nos ensaios a 25°C, as reduções variaram de 38,66 a 75,93% e de 17,94 a 71,79% para os respectivos fungos.

Dados obtidos previamente (Tabela 2) mostram que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresenta como constituintes majoritários os compostos terpinen-4-ol (56,80%),  $\gamma$ -terpineno (19,30%) e  $p$ -cimeno (9,84%). No óleo de *M. quinquenervia*, são encontrados  $\alpha$ -pineno (61,37%) e linalol (22,08%) como compostos principais; ao passo que o óleo extraído das folhas de *B. citriodora* é constituído, em maior proporção, pelo componente citral (91,19%). Embora os óleos apresentem uma composição química distinta, não foram observadas diferenças estatísticas entre os mesmos e suas concentrações, com exceção do óleo de *M. alternifolia*, que apresentou maior porcentagem de redução da micotoxina para *A. niger*, incubado a 25°C e o óleo de *B. citriodora*, que apresentou menor redução, nessas condições.

Tabela 2 Composição química dos óleos essenciais de *B. citriodora*, *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*.

Composto	IRcal	IRlit	BK	M1FL	M2FL
Isobutil-isobutirato	904	908	-	-	0,90
$\alpha$ -Pinoeno	929	932	-	2,72	<b>61,37</b>
$\beta$ -Pinoeno	970	974	-	-	1,53
$\alpha$ -Felandreno	996	1002	-	-	1,59
$\alpha$ -2-Careno	1009	1001	-	5,47	-
$\rho$ -Cimeno	1017	1020	-	<b>9,84</b>	3,24
Limoneno	1021	1024	-	-	-
1,8-Cincole	1024	1026	-	-	0,05
1,8-Cineol	1026	1025	-	-	-
Linalol	1095	1092	-	-	<b>22,08</b>
<i>endo</i> -Fenchol	1107	1114	-	-	-
<i>exo</i> -Fenchol	1108	1118	-	-	0,46
6-Canfenol	1119	1111	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarveol	1134	1135	-	-	1,40
$\gamma$ -Terpineno	1052	1054	-	<b>19,30</b>	-
Pinocarvona	1158	1160	-	-	1,00
Borneol	1161	1165	-	-	-
Terpinen-4-ol	1177	1174	-	<b>56,80</b>	-
$\alpha$ -Terpineol	1186	1188	-	2,58	-
Mirtenol	1191	1194	-	-	-
Neral	1236	1235	<b>39,82</b>	-	-
Geranial	1266	1264	<b>51,37</b>	-	-
Total (%)			91,19	96,71	93,62

IR cal. – Índice de retenção calculado; IR lit. – Índice de retenção da literatura; BK- óleo essencial das folhas de *B. citriodora* M1FL- óleo essencial das folhas de *M. alternifolia*; M2FL- óleo essencial das folhas de *M. quinquenervia*.

Jersek et al. (2014), estudando a atividade dos OEs obtidos do tomilho (*Origanum vulgare* L.), menta (*Mentha piperita* L.), erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) e do pinheiro (*Abies alba* Mill.) também constataram a importância desses produtos na redução de OTA por *Penicillium verrucosum*. Afirmam que a combinação de mono e sesquiterpenos, classes de compostos encontradas nos OEs obtidos no presente estudo, favorece a inibição do crescimento e da produção de toxinas pelos fungos.

Estudos de Sonker et al. (2014) confirmam que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.), constituído por 92,28% do composto citral, também atua na redução de micotoxinas produzidas pelos fungos *A. niger*, *A. flavus* e *A. ochraceus*. Terzi et al. (2007), investigando o efeito do óleo essencial de *M. alternifolia* e seus constituintes majoritários, terpinen-4-ol,  $\gamma$ - terpineno e 1,8-cineol sobre *Pyrenophora graminea*, *Fusarium graminearum* e *F. culmorum*, observaram que o constituinte terpinen-4-ol foi o mais eficiente na redução do crescimento micelial das espécies fúngicas. Assim, sugere-se que os compostos citral e terpinen-4-ol possam ser os responsáveis pela atividade antiocrotogênica de *B. citriodora* e *M. alternifolia*, respectivamente.

De acordo com Sokolić-Mihalak et al. (2012), os mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre os fungos ainda não estão totalmente elucidados. Alguns agentes antifúngicos atuam na biossíntese do ergosterol das hifas dos fungos (componente lipídico fúngico); a ausência desse componente induz o colapso da célula fúngica (micélio) e a interrupção do crescimento micelial (corpo fúngico) (HUA et al., 2014).

Yamamoto-Ribeiro et al. (2013), estudando o efeito do OE de *Zingiber officinale* (gengibre) sobre o fungo *Fusarium verticillioides*, observaram um aumento na produção de ergosterol utilizando-se a concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e inibição de 57 e 100% nas concentrações de 4000 e 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. De acordo com Lucini et al. (2006), alguns compostos podem ocasionar a peroxidação lipídica em fungos, o que induz uma resposta adaptativa, reprogramação de expressão gênica para proteger a estrutura da parede celular e, conseqüentemente, aumento na biossíntese do ergosterol.

Hua et al. (2014), avaliando o efeito de óleos essenciais e de alguns compostos sobre o crescimento de *Aspergillus ochraceus* e na produção de OTA, verificaram que o composto citral não inibiu a síntese de ergosterol nas concentrações de 25 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; no entanto, a biossíntese foi influenciada

por ele na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Foi observada total inibição na produção de OTA para o monoterpene nas concentrações de 75 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diferindo-se dos resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, ressalta-se que as concentrações utilizadas pelos autores são superiores às utilizadas nos ensaios para os OEs, assim como diferentes espécies fúngicas foram utilizadas no presente trabalho. Além disso, o óleo essencial de *B. citriodora*, por exemplo, é constituído pelo componente majoritário citral, havendo a presença de compostos minoritários que poderão influenciar a atividade do óleo.

De fato, sugere-se que a atividade do citral encontrada por Hua et al. (2014) na redução da produção da micotoxina não é decorrente da diminuição da massa fúngica, mas pode estar relacionada à supressão da transcrição de genes da biossíntese de OTA, como o gene policetídeo sintase (*pks*), responsável pela síntese da diidroisocumarina e envolvido nos primeiros passos da via de formação da ocratoxina A no metabolismo de *A. carbonarius* (GALLO et al., 2014) e *A. niger* (CASTELLÁ et al., 2015).

Contudo, sugere-se a utilização de óleos essenciais nos produtos alimentícios susceptíveis à contaminação por fungos produtores de OTA, sendo necessária a realização de ensaios *in vivo* para confirmar a eficácia desses óleos; devem ser avaliados toxicologicamente para atestar a segurança de seu uso no consumo humano. Em adição, as análises nos produtos alimentícios irão trazer informações sobre possíveis alterações nas propriedades organolépticas mediante a adição dos óleos.

#### **4 CONCLUSÃO**

Os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. quinquenervia* e *B. citriodora* influenciaram a produção de OTA pelos fungos *A. carbonarius* e *A. niger*.

Nos ensaios realizados a 15°C, verificou-se que os óleos propiciaram redução de OTA variando de 56,70 a 76,93% e de 54,78 a 98,68%, para as espécies fúngicas *A. carbonarius* e *A. niger*, respectivamente. A 25°C, as reduções variaram de 38,66 a 75,93% e de 17,94 a 71,79% para os respectivos fungos.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização dos óleos essenciais apresenta-se de maneira multidisciplinar devido à grande variedade de ações biológicas, bem como por sua aplicabilidade em diversas áreas.

Os bioensaios citogenéticos utilizando plantas como organismo teste possibilitaram a avaliação dos mecanismos de ação dos compostos presentes no óleo essencial de *B. citriodora* sobre o DNA do organismo exposto. Esses testes representam uma combinação de métodos eficiente para realização de um *screening* de citogenotoxicidade, podendo extrapolar os resultados para humanos e demais organismos.

Contudo, os ensaios com células humanas auxiliaram na compreensão do mecanismo de indução de morte, observando-se diminuição da multiplicação celular e alterações no ciclo celular, sugerindo a indução de morte celular por apoptose para células das linhagens HepG2 e HT144 tratadas com o óleo essencial de *B. citriodora*.

Adicionalmente, os ensaios com eritrócitos humanos permitiram avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de *B. citriodora*, *M. alternifolia* e *M. quinquenervia*, embora não possam ser comparados às células normais, por exemplo, pois possuem uma estrutura diferente, mecanismos de ação distintos e não possuem material genético.

A habilidade do estresse oxidativo em provocar apoptose por meio de extenso dano celular tem sido associada com peroxidação lipídica e alterações nas proteínas do núcleo. Assim, a atividade dos óleos essenciais evidenciada em alguns ensaios antioxidantes permite associar à redução dos radicais livres, com consequente diminuição do estresse oxidativo.

Além disso, a atividade demonstrada pelos óleos essenciais ao diminuir a síntese de ocratoxina A indica, conseqüentemente, uma redução no processo de carcinogênese decorrente da ação da micotoxina.

Dessa forma, os resultados obtidos propiciam a utilização comercial das espécies em estudo e a realização de novos estudos envolvendo atividades biológicas mais avançadas. Sugere-se a avaliação *in vivo* da eficácia terapêutica e segurança dos óleos essenciais para o consumo humano.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, abr. 2009.

CASTELLÁ, G. et al. Real time quantitative expression study of a polyketide synthase gene related to ochratoxin a biosynthesis in *Aspergillus niger*. **Food Control**, Guildford, v. 53, p. 147-150, July 2015.

CARSON, C. F. ; HAMMER, K. A. ; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n.1, p. 50-62, Jan. 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GALLO, A. et al. Identification and characterization of the polyketide synthase involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 179, p. 10-17, June 2014.

GARCIA, D. et al. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 432–439, Jan. 2011.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HUA, H. et al. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **Plos One**, Bethesda, v. 9, n. 9, p. 1-10, Sept. 2014.

JERSEK, B. et al. Effects of selected essential oils on the growth and production of ochratoxin A by *Penicillium verrucosum*. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 65, n. 2, p. 199–208, June 2014.

LAZAR-BAKER, E. E. et al. Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) honey. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 227-232, Mar. 2011.

LUCINI, E. I. et al. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, n. 7-8, p. 441–446, Aug. 2006.

MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contaminant of food crops pre and postharvest. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 150-163, Feb. 2011.

PADOVAN, A. et al. The molecular basis of host plant selection in *Melaleuca quinquenervia* by a successful biological control agent. **Phytochemistry**, New York, v. 71, n. 11-12, p. 1237-1244, Aug. 2010.

PASSAMANI, F. R. et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947–1952, Nov. 2014.

SOKOLIĆ-MIHALAK, D. et al. The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing Aspergilli. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, Zagreb, v. 63, n. 4, p. 457-462, Dec. 2012.

SONKER, N. et al. Assessment of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf essential oil as herbal preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, and antiochratoxin activities and *in vivo* efficacy during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 628-634, Apr. 2014.

TERZI, V. et al. *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, p. 613-618, 2007.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Philadelphia, v. 11, p. 463-471, 1963.

WANG, H. et al. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 229- 237, Mar. 2012.

YAMAMOTO-RIBEIRO, M. M. et al. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 3, p. 3147-3152, Dec. 2013.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – Cromatograma dos óleos essenciais das plantas estudadas

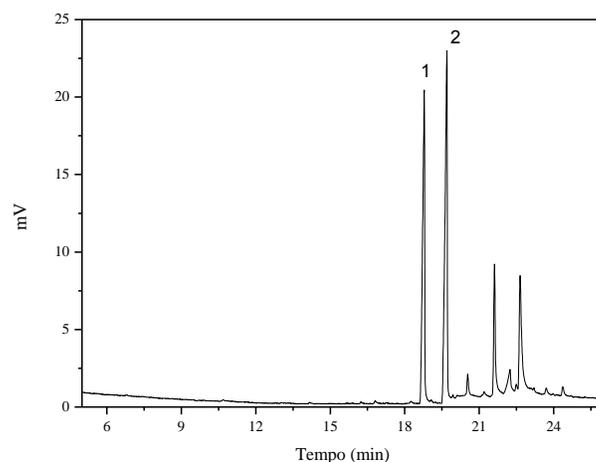


Figura 1A Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Backhousia citriodora*, constituído pelos compostos (1) neral e (2) geranial.

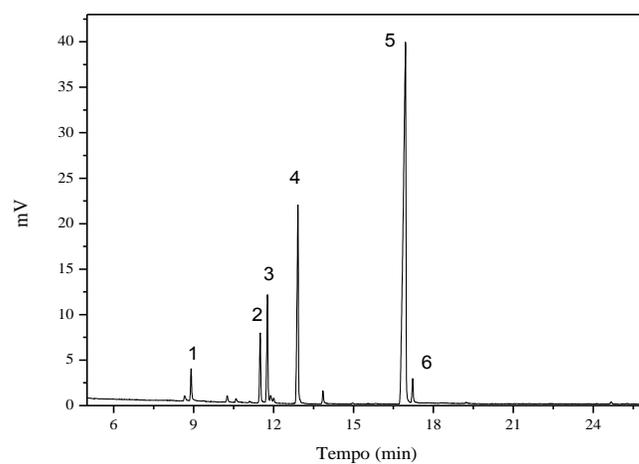


Figura 2A Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Melaleuca alternifolia*, constituído pelos compostos (1)  $\alpha$ -pineno, (2)  $\alpha$ -2-careno, (3)  $\rho$ -cimeno, (4)  $\gamma$ -terpineno, (5) terpinen-4-ol e (6)  $\alpha$ -terpineol.

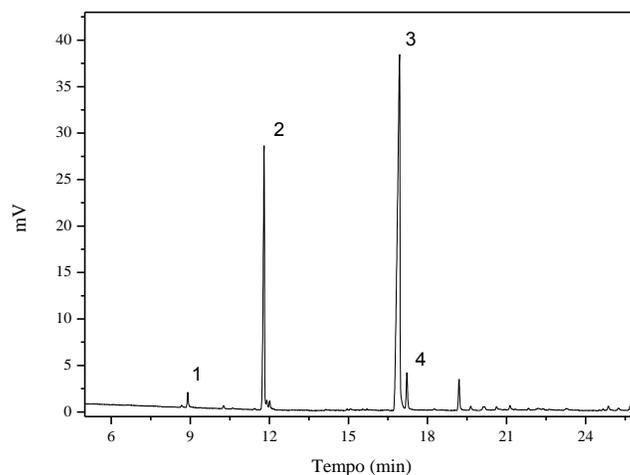


Figura 3A Cromatograma do óleo essencial dos frutos de *Melaleuca alternifolia*, constituído pelos compostos (1)  $\alpha$ -pineno, (2)  $\rho$ -cimeno, (3) terpinen-4-ol e (4)  $\alpha$ -terpineol.

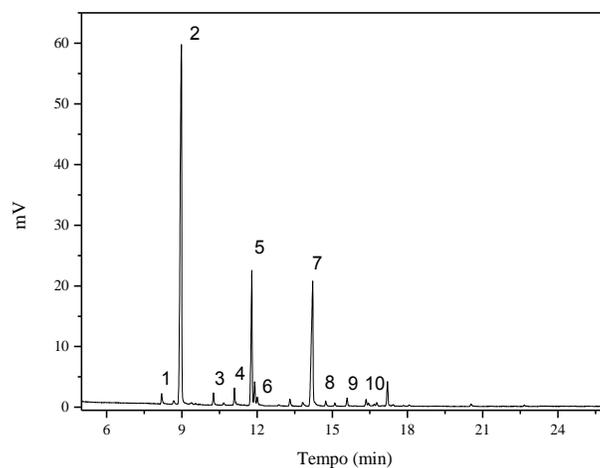


Figura 4A Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Melaleuca quinquenervia*, constituído pelos compostos (1) isobutil-isobutirato, (2)  $\alpha$ -pineno, (3)  $\beta$ -pineno, (4)  $\alpha$ -felandreno, (5)  $\rho$ -cimeno, (6) 1,8-cincole, (7) linalol, (8) *exo*-fenchol, (9) *trans*-pinocarveol e (10) pinocarvona.

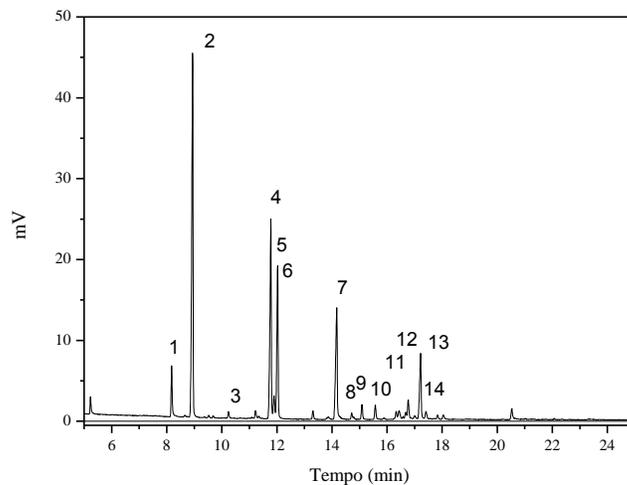


Figura 5A Cromatograma do óleo essencial dos frutos de *Melaleuca quinquenervia*, constituído pelos compostos (1) isobutil-isobutirato, (2)  $\alpha$ -pineno, (3)  $\beta$ -pineno, (4)  $p$ -cimeno, (5) limoneno, (6) 1,8-cineol, (7) linalol, (8) *endo*-fenchol, (9) 6-canfenol, (10) *trans*-pinocarveol, (11) borneol, (12) terpinen-4-ol, (13)  $\alpha$ -terpineol e (14) mirtenol.

## APÊNDICE B- Cromatograma da ocratoxina

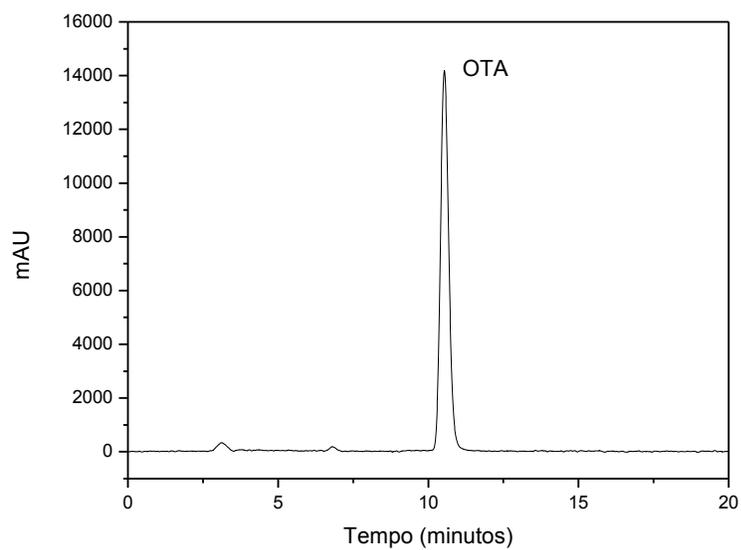


Figura 1B Cromatograma do padrão da OTA.

APÊNDICE C- Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da UFLA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização química e potencial biológico de óleos essenciais

**Pesquisador:** Maria das Graças Cardoso

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 42467115.6.0000.5148

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Lavras

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.174.295

**Data da Relatoria:** 07/08/2015

**Apresentação do Projeto:**

OK

**Objetivo da Pesquisa:**

OK

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

OK

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

OK

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências éticas foram atendidas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS 

Continuação do Parecer: 1.174.295

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ao Final do experimento o pesquisador deverá enviar relatório final, indicando ocorrências e efeitos adversos quando houver.

LAVRAS, 06 de Agosto de 2015

---

Assinado por:  
Glancarla Aparecida Botelho Santos  
(Coordenador)