



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RENIEIDY FLÁVIA CLEMENTE DIAS

Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da
Psidium myrtoides O. Berg (Araçá-roxo)

UBERLÂNDIA-MG

2019



RENIEIDY FLÁVIA CLEMENTE DIAS

Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da *Psidium myrtilodes* O. Berg (Araçá-roxo)



Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof. Dr. Francisco Tôrres de Aquino

Coorientadora: Profa. Grace Gosmann (UFRGS)

UBERLÂNDIA-MG

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

D541 2019	<p>Dias, Renieidy Flávia Clemente, 1989- Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg (Araçá-roxo) [recurso eletrônico] / Renieidy Flávia Clemente Dias. - 2019.</p> <p>Orientador: Francisco José Tôrres de Aquino. Coorientadora: Grace Gosmann. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2067 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. de Aquino, Francisco José Tôrres , 1961-, (Orient.). II. Gosmann, Grace, 1961-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.</p>	CDU: 54
--------------	---	---------

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 304, PPQUI				
Data:	Dezessete de junho de dois mil e dezenove	Hora de início:	9:00	Hora de encerramento:	14:15
Matrícula do Discente:	11722QMI004				
Nome do Discente:	Renieidy Flávia Clemente Dias				
Título do Trabalho:	Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg (Araçá-roxo)				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química de Produtos Naturais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Prospecção fitoquímica, atividade antioxidante e antimicrobiana de espécies do cerrado.				

Reuniu-se no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Raquel Maria Ferreira de Sousa - IQUFU; Fabiana Barcelos Furtado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho e Francisco José Torres de Aquino, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Francisco José Torres de Aquino, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Francisco José Torres de Aquino, Presidente**, em 19/06/2019, às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/06/2019, às 17:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Barcelos Furtado, Usuário Externo**, em 26/06/2019, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1337534** e o código CRC **69BA333A**.



Estudo da composição química e atividades biológicas do óleo volátil da *Psidium myrtoides* O. Berg (Araçá-roxo)

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 17 de junho de 2019.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco Tôrres de Aquino – Instituto de Química
(Orientador- UFU)

Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa
(Examinadora– UFU)

Prof. Dra. Fabiana Barcelos – Instituto de Química
(Examinadora- UNESP-Botucatu)

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais João Bosco e Neide, ao irmão Caio, e meus companheiros caninos Napoleão e Dylan, que são meu suporte diariamente. O amor e o carinho de vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

Dele.

Por Ele.

Para Ele.

(Romanos 11:6)

“Nada na vida é para ser temido, apenas para ser entendido”

(Marie Curie 1867-1934)

“Para os crentes Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda a reflexão”.

(Max Planck 1858-1947)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus.

Aos meus pais, João Bosco e Neide pelo amor, carinho, amizade, apoio moral e financeiro.

Ao meu irmão Caio, pelo amor e apoio moral.

Agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Aquino e a minha coorientadora Prof. Dra. Grace Gosmann da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade oferecida e também por sua confiança, compreensão e apoio.

À professora Dra. Cássia Dias do Laboratório de Genética (LABGEN) pela colaboração e parceria nos testes biológicos.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e ao Prof. Dr. Luís Carlos Scalon Cunha pela realização dos testes antibacterianos e antifúngicos.

Ao Allisson Benatti Justino, doutorando em Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela realização dos testes enzimáticos e de capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC).

A Mylla Costa, doutoranda em Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia com os testes com protozoários e de citotoxicidade.

Agradeço ao Prof. Antônio da Hora Machado, que foi a uma das melhores amizades que conquistei na UFU e na minha vida.

A todos os membros do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (*NuPPeN*), principalmente os colegas de laboratório (Thamires, Rafael, John, Tiara, Vanessa, Marília, Michelle, Marcus Vinicius, Paolla), que contribuíram para que o trabalho desenvolvido ficasse mais leve na hora de sua execução.

Agradeço imensamente a Mayta e ao Rodrigo Munhõz da coordenação de pós-graduação em Química por toda a gentileza a mim prestada durante todo o período do mestrado.

Agradecimento especial à CAPES pela bolsa concedida.

Aos membros da Comissão Avaliadora, pela aceitação do convite para compor a banca, meus agradecimentos pela atenção e contribuições valiosas para conclusão deste trabalho.

A todos os funcionários do Instituto de Química da UFU, que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

O presente trabalho teve objetivo geral de avaliar a composição química e as propriedades biológicas do óleo volátil da planta *Psidium myrtoides* O. Berg. Os óleos voláteis foram extraídos das folhas frescas e das folhas secas no período seco e chuvoso. A extração foi realizada por hidrodestilação com auxílio do aparelho de Clevenger. A identificação e variação da composição química dos óleos voláteis obtidos do período de chuva e do período de seca foi determinada por CG/EM. Obteve-se 25 compostos foram identificados ao total no período de seca, e 22 compostos identificados ao total no período de chuva (para ambos óleos voláteis das folhas frescas e das folhas secas). Tanto no período de seca quanto no período de chuva (para ambos óleos voláteis das folhas frescas e das folhas secas), os compostos majoritários foram: α -copaeno, trans-cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno, éoxido de humuleno II e α -bisabolol. No óleo volátil obtido no período de seca da folha seca houve maior presença de sesquiterpenos oxigenados (41,32%), enquanto, no óleo volátil obtido da folha fresca, no mesmo período, a presença de sesquiterpenos oxigenados (36,00%) foi menor. No óleo volátil obtido no período de chuva da folha fresca houve maior presença de sesquiterpenos oxigenados (52,34%). Já no óleo volátil obtido no mesmo período, a partir da folha seca, houve menor presença de sesquiterpenos oxigenados (37,21%). A avaliação da capacidade de sequestro do radical peroxil (método ORAC), demonstrou que todos os óleos voláteis apresentaram atividade antioxidante, destacando-se o óleo volátil da folha fresca do período de chuva com a maior atividade antioxidante (2491,1 $\mu\text{mol eq/q}$), sendo a atividade associada pela presença maior de sesquiterpenos oxigenados. A atividade antimicrobiana contra patógenos orais anaeróbicos e aeróbicos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Em geral, todos os óleos apresentaram baixa atividade contra os microorganismos anaeróbicos e aeróbicos avaliados, destacando-se *Streptococcus sanguinis* com o CIM de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentando atividade moderada. A atividade antifúngica de todos os óleos voláteis apresentaram atividade forte frente as leveduras *Candida glabrata*, destacando-se o CIM de 46,87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo volátil da folha seca, no período seco. Pelo cálculo de Índice de Seletividade (IS) constatou-se maior seletividade do *Trypanosoma cruzi* (CI_{50} 54,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; IS 0,12) do que toxicidade para as células Vero (CC_{50} 71,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para o óleo volátil testado a partir da folha seca, no período seco. Pelo cálculo de índice de seletividade constatou-se também maior seletividade pela *Leishmania amazonensis* (CI_{50} 31,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 55,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; IS 0,23; 0,08) do que toxicidade para as células Vero (CC_{50} 53,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 66,57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente, para o óleo volátil obtido da folha fresca e óleo volátil obtido da folha seca, no período chuvoso. Os resultados de *docking* molecular simulados revelaram que os componentes do óleo volátil da *Psidium myrtoides* formam complexos com as enzimas α -amilase e lipase pancreática e podem ser novos candidatos a fármacos no combate a diabetes tipo II e a obesidade.

Palavra-chave: *Psidium myrtoides* O. Berg; óleo volátil; atividade biológica.

ABSTRACT

The present work had a general objective of evaluating the chemical composition and the biologic properties of the volatile oil of the *Psidium myrtoides* O. Berg plant. Volatile oils were extracted from fresh leaves and dry leaves in the dry and rainy season. The extraction was performed by hydrodistillation using the Clevenger apparatus. The identification variation of the chemical composition of the volatile oils obtained from the rainy season and the dry period was determined by GC /MS. Twenty-five compounds were identified in the dry period, and 22 compounds were identified in the rainy season (for both volatile oils from fresh leaves and dry leaves). In both the dry and rainy periods (for both volatile oils of fresh leaves and dry leaves), the major compounds were: α -copaene, trans-caryophyllene, α -humulene, caryophyllene oxide, humulene epoxide II and α -bisabolol. The presence of oxygenated sesquiterpenes (41.32%) was higher in the volatile oil obtained from the dry leaf, while in the volatile oil obtained from the fresh leaf, the presence of oxygenated sesquiterpenes was lower (36, 00%). In the volatile oil obtained from the fresh leaf, in the rainy period, there was a greater presence of oxygenated sesquiterpenes (52.34%). In the volatile oil obtained in the same period (rainy period), from the dry leaf, there was less presence of oxygenated sesquiterpenes (37.21%). The evaluation of the free-radical scavenging capacity using the peroxy radical (ORAC method), showed that all volatile oils presented antioxidant activity, especially the volatile oil of the fresh leaf of the rainy season with the highest antioxidant activity (2491.1 $\mu\text{moleq/g}$), being the activity associated with the greater presence of oxygenated sesquiterpenes. The antimicrobial activity against anaerobic and aerobic oral pathogens was evaluated by broth microdilution method. In general, all the oils presented low activity against the aerobic and anaerobic microorganisms evaluated, being *Streptococcus sanguinis* with MIC value of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, representing moderate activity. The antifungal activity of all volatile oils presented strong activity against *Candida glabrata* yeasts, with a MIC value of 46.87 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the volatile oil tested on the dry leaf in the dry period. By the selectivity index calculation greater selectivity by *Trypanosoma cruzi* IC₅₀ (54.05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) than toxicity for the Vero CC₅₀ cells (71.77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) was verified for the volatile oil tested of the dry leaf from the dry period. By the Selectivity Index (IS), greater selectivity of *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ 54.10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; IS 0.12) was verified than toxicity to Vero cells (CC₅₀ 71.77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) for the volatile oil tested from the dry leaf, in the dry period. The selectivity index was also found to be more selective for *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ 31.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 55.7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; IS 0.23; 0.08, respectively) than for cell toxicity Vero (CC₅₀ 53.79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 66.57 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectively, for the volatile oil obtained from the fresh leaf and volatile oil obtained from the dry leaf, in the rainy season. Simulated molecular docking results have revealed that the volatile oil components of *Psidium myrtoides* form complexes with the α -amylase and pancreatic lipase enzymes, and may be new drug candidates in the fight against type II diabetes and obesity.

Key-words: *Psidium myrtoides* O. Berg; essential oil; biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Compostos bioativos encontrados em plantas medicinais _____	18
Figura 2- Fotografias da árvore Pau-brasil (<i>Caesalpinia echinata</i> Lam.) e estruturas químicas das substâncias extraídas do Pau-Brasil _____	19
Figura 3- Estrutura da morfina que é extraída da <i>Papaver somniferum</i> _____	20
Figura 4- Novos medicamentos aprovados entre 1981-2014 _____	21
Figura 5- Principais classes de terpenos: representantes acíclicos, monocíclicos de ambos os hidrocarbonetos terpênicos e terpenos oxigenados _____	24
Figura 6- Rotas biossintéticas para obtenção dos metabólitos secundários nas plantas (a) e mecanismo de formação do ácido mevalônico (b) _____	26
Figura 7- Alguns fatores que podem influenciar diretamente a produção dos metabólitos secundários pelas plantas _____	27
Figura 8- Estruturas químicas de alguns flavonóides encontrados em plantas _____	29
Figura 9- Distribuição geográfica da <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg _____	33
Figura 10- Colônias de diferentes espécies de <i>Candida</i> após crescimento por 48 horas a 37 °C em meio CHROMagar _____	37
Figura 11- Fotografias de Infecções fúngicas _____	37
Figura 12- Distribuição de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , baseado na estimativa oficial e estado de transmissão do vetor, 2006-2009 _____	39
Figura 13- Estruturas químicas do Nifurtimox e Benznidazol _____	40
Figura 14- Estado de endemicidade da leishmaniose visceral em todo mundo, 2016 _____	42
Figura 15- Estrutura química da Anfotericina B e a Paromicina _____	43
Figura 16- Estrutura da fluoresceína (A) e diclorofluoresceína (B) _____	44
Figura 17- Estrutura tridimensional da α -amilase da saliva humana _____	45
Figura 18- Estrutura tridimensional da lipase pancreática humana _____	47
Figura 19- Papel fisiológico das lipases na absorção de lipídios _____	48
Figura 20- Estrutura do ácido carnósico encontrado nas folhas de <i>Salvia officinalis</i> _____	49
Figura 21- Esquema de interação do fármaco (ligante) com sítio da enzima _____	50
Figura 22- Visualização da interação da α -amilase e dos compostos ativos no óleo essencial de SCKL _____	52

Figura 23- Fotografias da planta <i>Psidium myrtooides</i> O. Berg (Araçá-roxo) utilizada neste estudo _____	56
Figura 24- Fotografias das etapas do Processo de extração _____	57
Figura 25- Ilustração de uma placa de 96 poços utilizada no experimento de microdiluição após adição de resazurina para a determinação da concentração inibitória mínima das bactérias aeróbicas _____	60
Figura 26- Placa de 96 poços utilizada para os testes de <i>Leishmania</i> do óleo volátil _____	64
Figura 27- Representação 3D do complexo alfa-amilase (1JXJ) com acarbose obtida no Protein Bank _____	67
Figura 28- Representação 3D do complexo de colipase pancreático lipase (1LBP) com um ligante alquil fosfonato obtida no Protein Bank _____	68
Figura 29- Representação da janela de cálculo de “Docking ” para o receptor-ligante utilizando ArgusLab4.0 _____	70
Figura 30- Diagrama das etapas seguidas do docking molecular _____	71
Figura 31- Fotografia do óleo volátil obtido das folhas de <i>Psidium myrtooides</i> _____	72
Figura 32- Cromatogramas de CG-EM dos óleos voláteis de <i>P. myrtooides</i> da época de ____	74
Figura 33- Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas frescas na da <i>P. myrtooides</i> na época de seca _____	77
Figura 34- Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas secas na da <i>P. myrtooides</i> na época de seca _____	78
Figura 35- Cromatogramas de CG-EM dos óleos voláteis de <i>P. myrtooides</i> na época de chuva _____	79
Figura 36- Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas frescas na da <i>P. myrtooides</i> na época de chuva _____	82
Figura 37- Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas secas na da <i>P. myrtooides</i> na época de chuva _____	83
Figura 38- Representação dos registros da família Myrtaceae no EssoilDB: Compostos químicos mais frequentes e suas estruturas químicas _____	85
Figura 39- Classe de Compostos químicos descritos da família Myrtaceae _____	85
Figura 40- Compostos químicos mais frequentes na família Myrtaceae e suas estruturas químicas _____	86
Figura 41- Representação dos registros do gênero <i>Psidium</i> no EssoilDB: Compostos químicos mais frequentes e suas estruturas químicas _____	87
Figura 42- Classe de Compostos químicos descritos do gênero <i>Psidium</i> no EssoilDB _____	87

Figura 43- Representação dos registros do gênero <i>Psidium</i> no EssoilDB: Espécies, compostos químicos e suas estruturas químicas _____	88
Figura 44- Atividade antioxidante (ORAC) do óleo volátil de acordo com a sazonalidade _	91
Figura 45- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>trans</i> -cariofileno e os principais aminoácidos, interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	101
Figura 46- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -humuleno e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	102
Figura 47- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante óxido de <i>Cariofileno</i> , e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	103
Figura 48- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>alfa-bisabolol</i> , e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	104
Figura 49- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>globulol</i> , e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	105
Figura 50- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>cubenol</i> e os principais aminoácidos, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	106
Figura 51- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>selina-3,11-dien-6-α-ol</i> , e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	107
Figura 52- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5-α-ol</i> , e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	108
Figura 53- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -copaeno, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ _____	109
Figura 54- Estrutura química da <i>acarbose</i> _____	111
Figura 55- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante <i>trans</i> -cariofileno e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima 1LPB _____	113

Figura 56- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -humuleno e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	114
Figura 57- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante óxido de cariofileno e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	115
Figura 58- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -bisabolol e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	116
Figura 59- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante globulol, e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	117
Figura 60- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante cubenol, e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	118
Figura 61- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante selina-3,11-dien-6- α -ol, e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	118
Figura 62- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	119
Figura 63- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -copaeno e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima ILPB _____	120
Figura 64- Estrutura química da orlistate _____	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais espécies do gênero <i>Psidium</i> na região Centro-Oeste do Brasil, seus nomes populares, potencial de usos e áreas de ocorrência	32
Tabela 2- Alguns dos constituintes químicos mais importantes presente no gênero <i>Psidium</i> que apresentam atividade biológica.....	35
Tabela 3- Resultados dos estudos de docking de α -amilase com os quatro compostos ativos do óleo essencial de SCKL.....	51
Tabela 4- Reagentes e materiais utilizados.....	55
Tabela 5- Estrutura bidimensional (2D) dos ligantes que são gerados em 3D pelo software UCSF Chimera a partir do código SMILES.....	69
Tabela 6- Rendimento do óleo volátil da <i>P. myrtooides</i> nos períodos de seca e chuva	72
Tabela 7- Composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas na época de seca.....	75
Tabela 8- Compostos químicos dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas no período de seca identificados por CG-EM.....	76
Tabela 9- Composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas no período de chuva	80
Tabela 10- Compostos químicos dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas na época de chuva identificados por CG-EM	81
Tabela 11- Resultados da atividade antibacteriana (CIM) <i>in vitro</i> dos óleos voláteis da <i>Psidium myrtooides</i>	94
Tabela 12- Resultados de leveduras (CIM) <i>in vitro</i> dos óleos essenciais da <i>Psidium myrtooides</i>	96
Tabela 13- Resultados da atividade leishmanicidal e tripanossomicidas (CI_{50}) <i>in vitro</i> , citotóxicidade (CC_{50}) e Índice de Seletividade (IS) dos óleos essenciais da <i>Psidium myrtooides</i>	96
Tabela 14- Resultados de inibição enzimática da alfa-amilase pelas amostras de óleo volátil das folhas frescas e secas a partir do estudo sazonal.....	98
Tabela 15- Resultados de docking molecular e alguns IC_{50} da α -amilase com os constituintes químicos do óleo volátil da <i>P. myrtooides</i>	100
Tabela 16- Inibição enzimática da α -glicosidase pelas amostras de óleo volátil	110
Tabela 17- Inibição de lipase pelas amostras de óleo volátil.....	111
Tabela 18- Resultados de docking molecular e alguns IC_{50} da lipase com os constituintes químicos do óleo volátil da <i>P. myrtooides</i>	112

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC (do português): Coleção de cultura americana

(-) B-PE: B-ficoeritrina

CC₅₀: Concentração citotóxica de 50%

CG –EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CG-DIC: Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

IC₅₀: Concentração inibitória média

CIM: Concentração inibitória mínima

CLSI (do português): Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

DMAPP: Difosfato de dimetilalila

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazila

FPP: Difosfato de farnesila

GPP: Difosfato de geranila

IA: Índice aritmético

IPP: Isopentenila

MEP: Metileritrol-4-fosfato

MES: Ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico

N.I: Não identificado

NIST (do português): Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

OV: Óleo volátil

ORAC (do português): Capacidade de Absorção Radical de Oxigênio

(-) RPE: R-ficoeritrina

SCK: *Sabina chinensis* cv. O Kaizuka

UFC: Unidades formadoras de colônias

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

UV: Ultravioleta

UV-B: Ultravioleta 320–280 nm, também chamada de onda média.

VF: Volume final

VS: Volume da solução

Δ Abs: Variação da absorbância

ALA: Alanina

CYS: Cisteína

ASP: Aspartato

GLU: Glutamato

GLY: Glicina

HIS: Histidina

ILE: Isoleucina

LEU: Leucina

ASN: Asparagina

PRO: Prolina

GLN: Glutamina

ARG: Arginina

SER: Serina

THR: Treonina

VAL: Valina

TRP: Triptofano

TYR: Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Um breve histórico da utilização dos produtos naturais pelo homem e a descoberta de fármacos	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Óleos voláteis, classes de terpenos e metabolismo dos vegetais	23
2.2 Aspectos Gerais da família Myrtaceae	29
2.3 Gênero Psidium e potencial medicinal	30
2.4 <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg	33
2.5 Estudos biológicos e farmacológicos dos produtos naturais	36
2.5.1 Atividade antifúngica e antibacteriana	36
2.5.2 Doenças negligenciadas e o seu impacto mundial	39
2.5.3 Atividade antioxidante (ORAC)	44
2.5.4 Avaliação enzimática	45
2.5.5 Modelagem molecular	49
3. OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos específicos	54
4. METODOLOGIA	55
4.1 Materiais e equipamentos	55
4.2 Coleta do material vegetal	55
4.3 Determinação da umidade das folhas	56
4.4 Extração do óleo volátil	56
4.5 Caracterização e métodos: Análise do óleo volátil	57
4.6 Propriedades farmacológicas do óleo volátil da <i>Psidium myrtoides</i>	58
4.6.1 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> (ORAC)	58
4.6.2 Determinação da atividade antibacteriana	59
4.6.3 Determinação atividade antifúngica	61
4.6.4 Determinação da atividade citotóxica	62
4.6.5 Determinação da atividade antiprotozoário	62
4.6.6 Determinação da inibição das atividades enzimática	64
4.6.7 Docking molecular com as enzimas	67
4.6.7.1 Programas (softwares) utilizados	67
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 Rendimentos das amostras de óleo volátil	72
5.2 Composição química do óleo volátil de <i>Psidium myrtoides</i> O. Berg	74

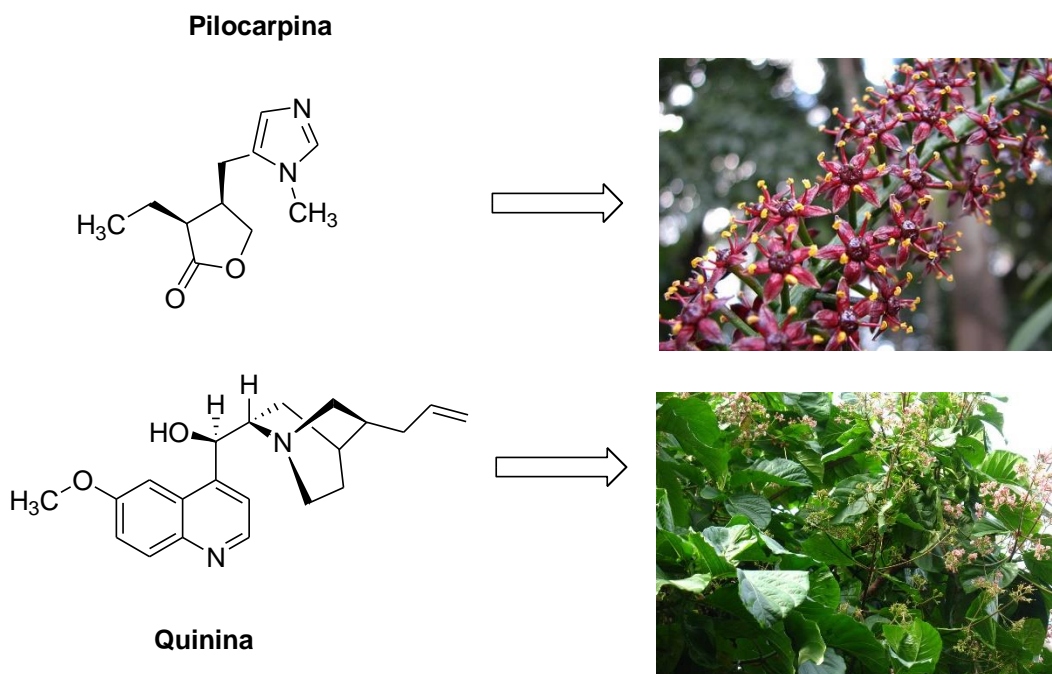
5.3 Avaliação da atividade antioxidante (ORAC) do óleo volátil _____	90
5.4 Avaliação da atividade antibacteriana _____	92
5.5 Avaliação da atividade antifúngica _____	95
5.6 Avaliação da atividade antiprotozoário e citotoxicidade _____	96
5.7 Avaliação de inibição enzimática e estudo de docking molecular _____	98
Tabela 16-Inibição enzimática da α -glicosidase pelas amostras de óleo volátil ____	110
• _____	118
6. CONCLUSÃO _____	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	124
<i>APÊNDICE A - Lista de trabalhos gerados a partir de resultados descritos na dissertação</i> _____	136
<i>APÊNDICE B- Identificação dos componentes do óleo volátil</i> _____	137
Figura 1- Comparação entre o espectro de massas obtido através do experimento e o espectro de massas teórico da biblioteca (método Adams) _____	138
Tabela 1-Tempos de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por CG-MS _____	139
Figura 2 - Espectro de massas do trans-cariofileno (sesquiterpeno hidrocarboneto) e proposta estrutural para alguns fragmentos _____	140
Figura 3- Espectro de massas do óxido de cariofileno (sesquiterpeno oxigenado) e proposta estrutural para alguns fragmentos _____	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 Um breve histórico da utilização dos produtos naturais pelo homem e a descoberta de fármacos

O uso das plantas nativas das Américas, quer como alimento ou remédio, é muito antigo. Registros arqueológicos relatam que os ameríndios (indígenas sul-americanos), já usavam algumas espécies há mais de 10 mil anos. Exemplos dessas plantas são o abacate (*Persea batatas* Mill.), a batata-doce (*Ipomoea batata* L. Lam.), a erva-mate mate (*Ilex paraguariensis* A. St. –Hill). No século XVI, no início da colonização, os espanhóis e os portugueses começaram a introduzir as plantas nativas brasileiras na Europa. Muitas substâncias bioativas foram descobertas a partir da utilização de muitas espécies de plantas medicamentosas pelos ameríndios, como a pilocarpina – obtida das folhas de espécies de *Pilocarpus* usada no tratamento de glaucoma; a quinina, obtida das cascas de espécies de *Cinchona* e usada como antimaláricos (DE OLIVEIRA; SEZEZERBOWSKI, 2006; SIMÕES; SCHENKEL; MELLO; MENTZ, 2017).

Figura 1-Compostos bioativos encontrados em plantas medicinais

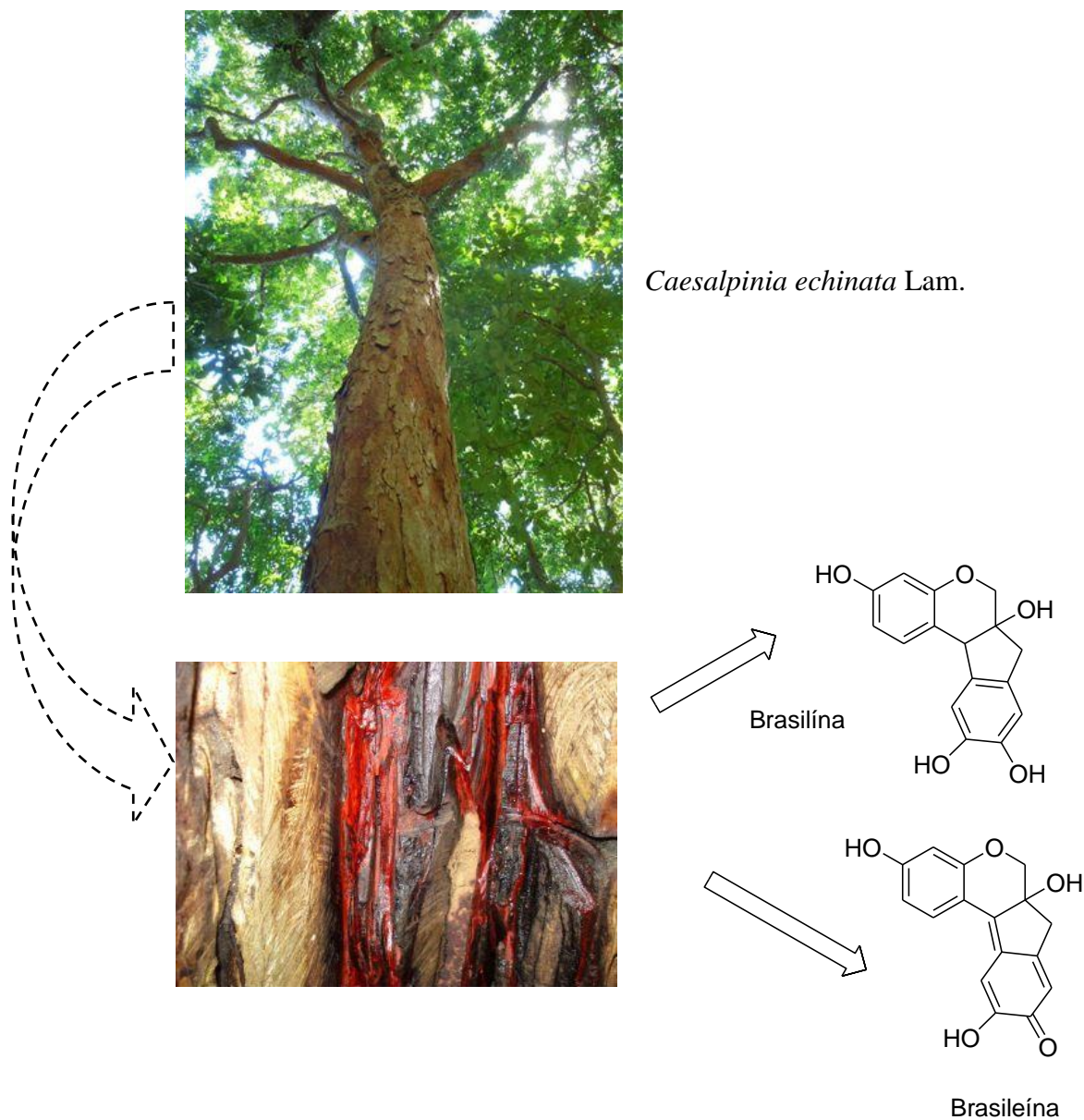


Fonte: A autora (2019).

Ainda no século XVI, também ocorreu a exploração e a popularização do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) na Europa. Dessa planta era obtido um pigmento (Figura 2)

que possuía um elevado valor comercial, na época, para o tingimento de tecidos, chamado brasilína que é o precursor do verdadeiro pigmento, de cor vermelha, o brasileína, obtida após a oxidação da brasilina (REZENDE, 2004).

Figura 2-Fotografias da árvore Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e estruturas químicas das substâncias extraídas do Pau-Brasil



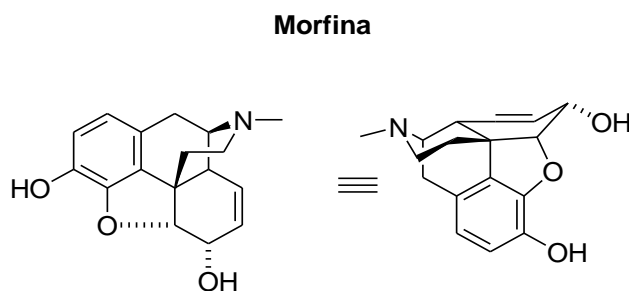
Fonte: Adaptado de REZENDE (2004).

Outro exemplo de grande descoberta para a humanidade foi a utilização da papoula (*Papaver somniferum*). O alemão Friedrich Wilhelm Sertürner (1783 - 1841) descobriu e isolou o *principium somniferum*, uma substância cristalina do ópio, um anestésico potente, que ele chamou de morfio, e mais tarde ficou conhecido como morfina (P. KLOCKGETHER-RADKE, 2002).

Figura 3- Estrutura da morfina que é extraída da *Papaver somniferum*



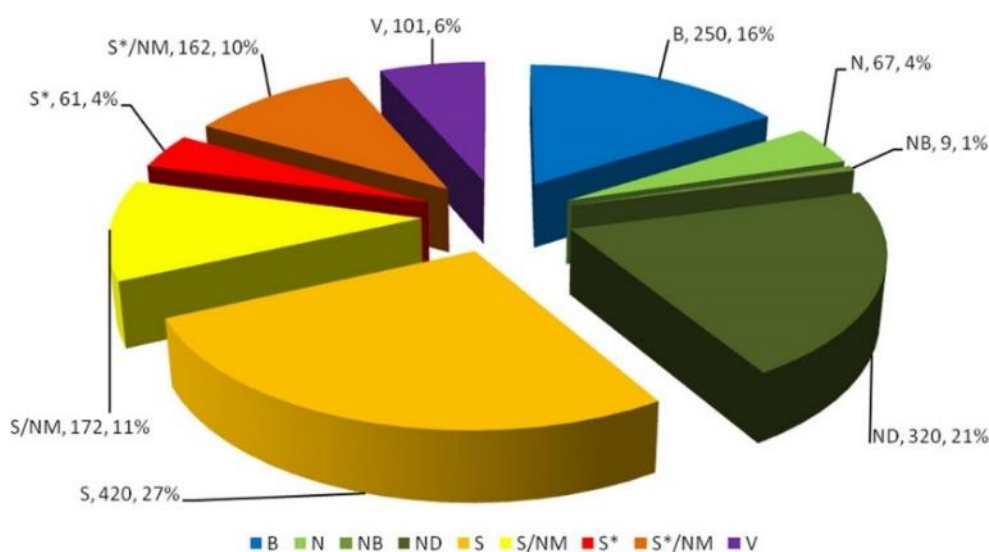
Papaver somniferum



Fonte: Adaptado de TABER; NEUBERT; RHEINGOLD (2002).

Já no século XXI, Newman e Cragg destacaram o papel dos produtos naturais na obtenção dos medicamentos, mostrando que grande parte de fármacos, tem origem a partir dos produtos naturais ou derivados de produtos naturais. A figura 4 representa distribuição percentual de fármacos aprovados, classificados de acordo com a sua origem, entre os anos 1981 e 2014. A partir do gráfico é possível concluir que, apesar dos fármacos desenvolvidos com base em produtos naturais não representarem o grupo com maior percentagem de aprovações, ainda detêm uma parte significativa (51%) relativa aos fármacos N; NB; ND; SNM; S* e S*/NM (NEWMAN; CRAGG, 2016). Além disso, eles afirmam que na natureza há muito o que ser explorado ainda, especialmente, no ambiente marinho e no microbiano. (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 4- Novos medicamentos aprovados entre 1981-2014



Legenda: Macromoléculas biológicas; N – Produto natural; NB – Fitoterápico; ND – Derivado semissintético de produto natural; S – Sintético; S* - Sintético com grupo farmacofórico de produto natural; NM – Produto natural mimetizado; V – Vacina. Sendo apresentado no gráfico o tipo de origem dos fármacos, a quantidade de fármacos e a porcentagem que esta classe representa; B- Macromolécula biológica.

Fonte: NEWMAN; CRAGG (2016).

O gráfico da figura 4 mostra a tendência para aprovação de fármacos com origem biológica (B) com o aumento na aprovação de 250,16%. Também se pode verificar um aumento na aprovação de fármacos de origem sintética (S e S/NM) com farmacóforo de produtos naturais (Compostos classificados com as letras S* e S*/NM) com aprovação de 10%. A principal razão para se verificar esta tendência é provavelmente o grande avanço na área da biotecnologia (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Parte das propriedades farmacológicas atribuídas aos produtos naturais é parcialmente creditada aos óleos essenciais. O termo "óleo essencial" foi utilizado no século XVI por *Paracelsus von Hohenheim*, médico e alquimista suíço, que nomeou o componente efetivo de uma droga chamada a "Quinta essencial". Durante o século XX, os óleos essenciais foram destinados quase inteiramente para confecção de perfumes, cosméticos e flavorizantes, mas usados também farmacologicamente com fins medicinais, o que vem estimulando a procura por substâncias biologicamente ativas (Edris, 2007).

A importância dos produtos naturais é indiscutível para nossa sociedade atual. Este reconhecimento foi demonstrado em 2015, durante a entrega do Prêmio Nobel de Medicina. A premiação agraciou três pesquisadores (Youyou Tu, Satoshi Omura e William Campbell), pelas suas contribuições por criarem novas terapias para combater doenças causadas por

vermes nematódeos, e também por desenvolverem uma nova alternativa de tratamento para malária. A pesquisa da farmacologista Youyou Tu envolveu a descoberta de um importante composto chamado artemisinina isolado de uma erva tradicional da medicina chinesa (*Artemisia annua*), que possui propriedades para combater a malária. A pesquisa dos cientistas William Campbell e Satoshi Omura envolve a descoberta da avermectina. A avermectina é um composto isolado a partir de culturas de bactérias do gênero *Streptomyces avermitilis*, que possui atividade biológica contra os vermes nematódeos (Nobel Prize, 2015). Tanto a avermectina como a artemisinina são moléculas descobertas com origem em produtos naturais. Sendo assim, o interesse contínuo nas pesquisas em moléculas com base em produtos naturais, vêm da diversidade estrutural e funcional que essas moléculas apresentam (SIMÕES et al., 2017).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Óleos voláteis, classes de terpenos e metabolismo dos vegetais

As plantas e os organismos vivos produzem uma quantidade imensurável de compostos com estruturas químicas de elevada complexidade, porém existem compostos que não cumprem papéis específicos no crescimento, na divisão celular e na manutenção da vida da planta, e são denominados metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são assim chamados pelo fato de serem produzidos a partir do metabolismo primário, isto é, são considerados derivados do metabolismo primário. Por exemplo, estruturas básicas de aminoácidos podem ser encontradas nas estruturas de alcalóides, e o ácido acético, que, via ácido mevalônico e malônico, tem sua estrutura incorporada na biossíntese de terpenóides. Já os metabólitos primários são: aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, vitaminas, entre outros. E estes compostos são responsáveis pela manutenção celular (como respiração, regulação, reprodução) da planta (SIMÕES et al., 2017).

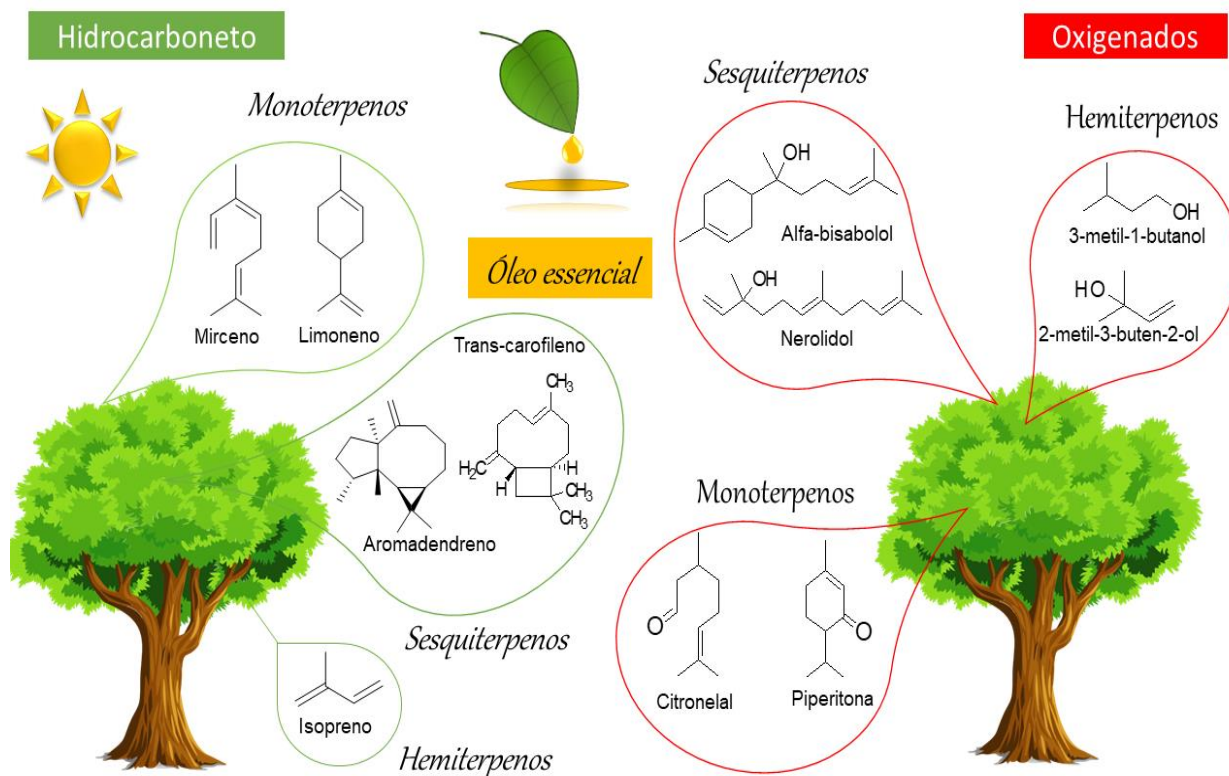
Os óleos essenciais também chamados de óleos voláteis são uma mistura de vários compostos lipofílicos (compostos derivados do metabolismo primário), que apresentam odor, e são líquidos à temperatura ambiente, obtidos de matérias-primas vegetais. Segundo a *International Standard Organization (ISO)*, os óleos voláteis são produtos obtidos de partes das plantas por meio de hidrodestilação, que não são fixos, pois têm a característica da volatilidade. Muitas substâncias compõem os óleos voláteis como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, cumarinas (SIMÕES et al., 2017).

Um dos componentes importantes dos óleos voláteis são terpenos. Os terpenos são significativos nos três principais papéis seguintes: (i) componentes das membranas celulares (triterpenos tipo esterol); (ii) componentes do fotossistema I e II (como os carotenóides, que são pigmentos naturais e tetraterpênicos (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017), e também cadeias de fitólitos diterpenóides de clorofilas); e (iii) como fitohormônios (por ex., a giberelina que é um composto isoprenóide formado por diterpenos), os quais constituem metabólitos bem conhecidos nas Angiospermas (CASTRO; BERGEMANN, 1973; KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008).

A nomenclatura dos terpenos (hemi-, mono-, sesqui-, di-, tri-, tetra-, etc) depende dos números de átomos de carbono que constitui a molécula, conforme figura 5. Já a classificação

de compostos orgânicos como terpenos depende da sua rota metabólica (KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008).

Figura 5-Principais classes de terpenos: representantes acíclicos, monocíclicos de ambos os hidrocarbonetos terpênicos e terpenos oxigenados

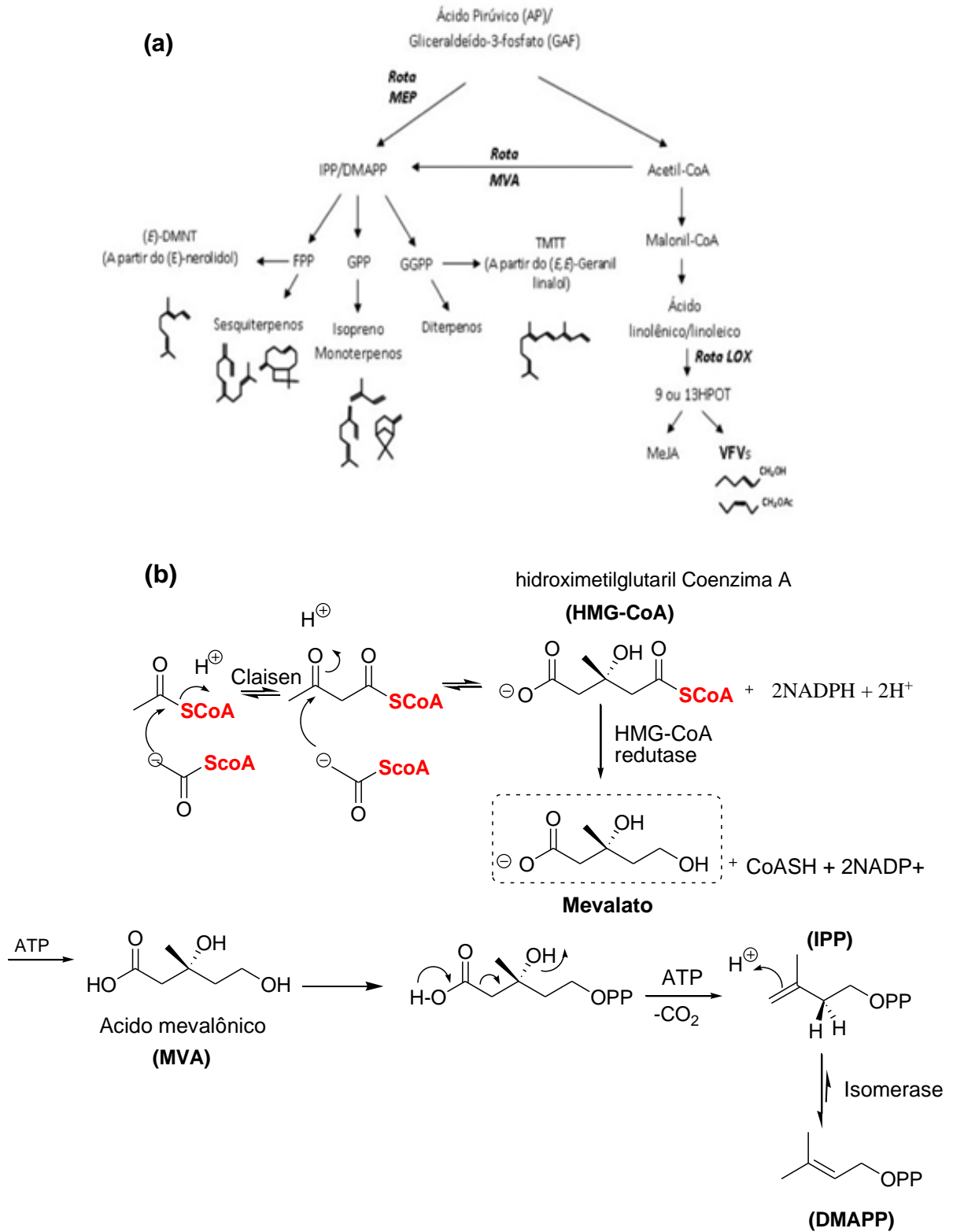


Fonte: Adaptada de KESZEI; BRUBAKER; FOLEY (2008).

Conforme se vê na figura 6, as duas principais rotas biossintéticas para produção de terpenos ocorrem em organelas diferentes da célula vegetal. Na rota do ácido mevalônico (6a), que ocorre no citoplasma, três moléculas de acetil-CoA (6b) irão condensar para formar o ácido mevalônico, que por sua vez vai sofrer reações de piro-fosforilação, descarboxilação, e desidratação para formar o isopentinildifosfato (IPP) (6b). Este isomeriza na presença de uma isomerase para formar o dimetil-alil-difosfato (DMAPP) (DEWICK, 2002). Este último também é biossintetizado pela rota do MEP que ocorre nos cloroplastos. Na rota MEP ocorre a reação de condensação entre gliceraldeído-3-fosfato e ácido piruvato que origina o DMAPP que está em equilíbrio com seu isômero, o isopentinildifosfato (IPP) (BREITMAIER, 2006). A partir destas rotas biossintéticas, diferentes classes de terpenóides vão se originar dessa

organização, e apresentar um número de carbonos múltiplos de 5. Monoterpenóides apresentam uma molécula com 10 carbonos, sesquiterpenóides apresentam uma molécula com 15 carbonos, e diterpenóides apresentam uma molécula com 20 carbonos. Nos cloroplastos, são sintetizados mono e diterpenóides, ao passo que os sesquiterpenóides originam-se no citoplasma. Porém, a separação compartimental dessas duas rotas não é absoluta, podendo haver mudanças (KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008; SIMÕES et al., 2017).

Figura 6- Rotas biossintéticas para obtenção dos metabólitos secundários nas plantas (a) e mecanismo de formação do ácido mevalônico (b)

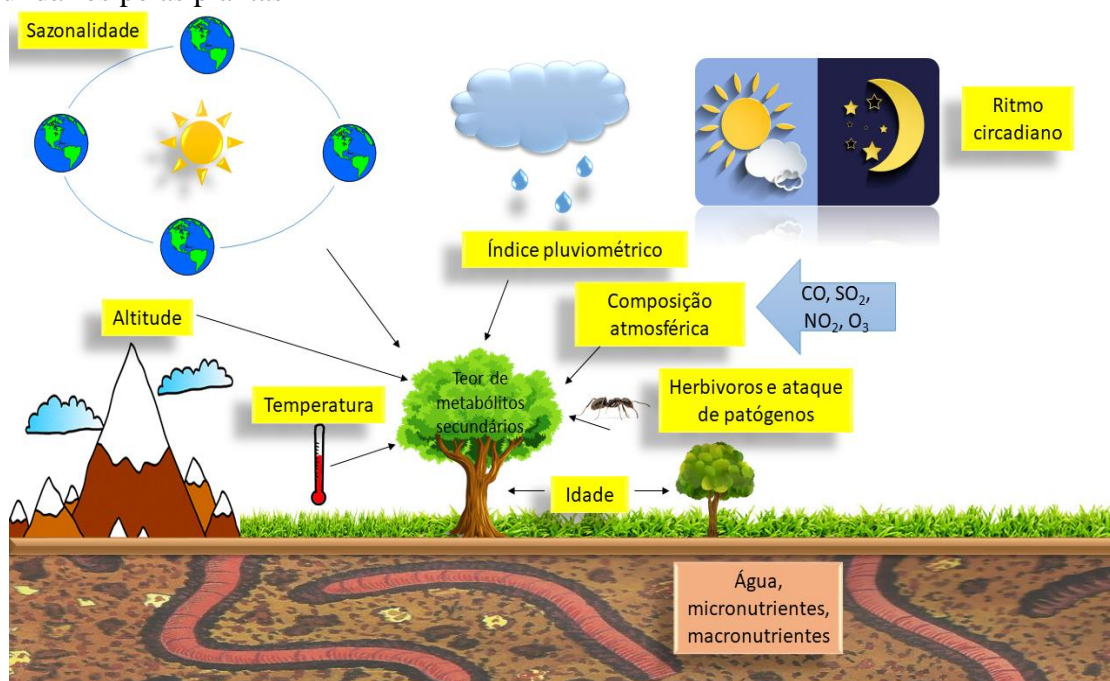


Fonte: (a) Adaptado de PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. (2013); (b) DEWICK (2002); BHAGAVAN, N.V.; HA, C.-E (2015).

Conforme o esquema da figura 7, alguns fatores podem influenciar diretamente a produção dos metabólitos secundários nas plantas, como por exemplo: sazonalidade, altitude, temperatura, índice pluviométrico, radiação UV, composição atmosférica, idade da planta, ataque de patógenos e herbívoros, entre outros. São relatadas em várias classes de metabólitos secundários, inclusive, nos óleos voláteis, uma variação na composição química de acordo com algumas épocas do ano.

Existem alguns estudos que comprovam essa mudança comportamental na produção de metabólitos secundários, como é o caso da erva de São João (*Hypericum perforatum*, utilizada no tratamento de depressões leves a moderadas), que aumentam de cerca de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 7- Alguns fatores que podem influenciar diretamente a produção dos metabólitos secundários pelas plantas



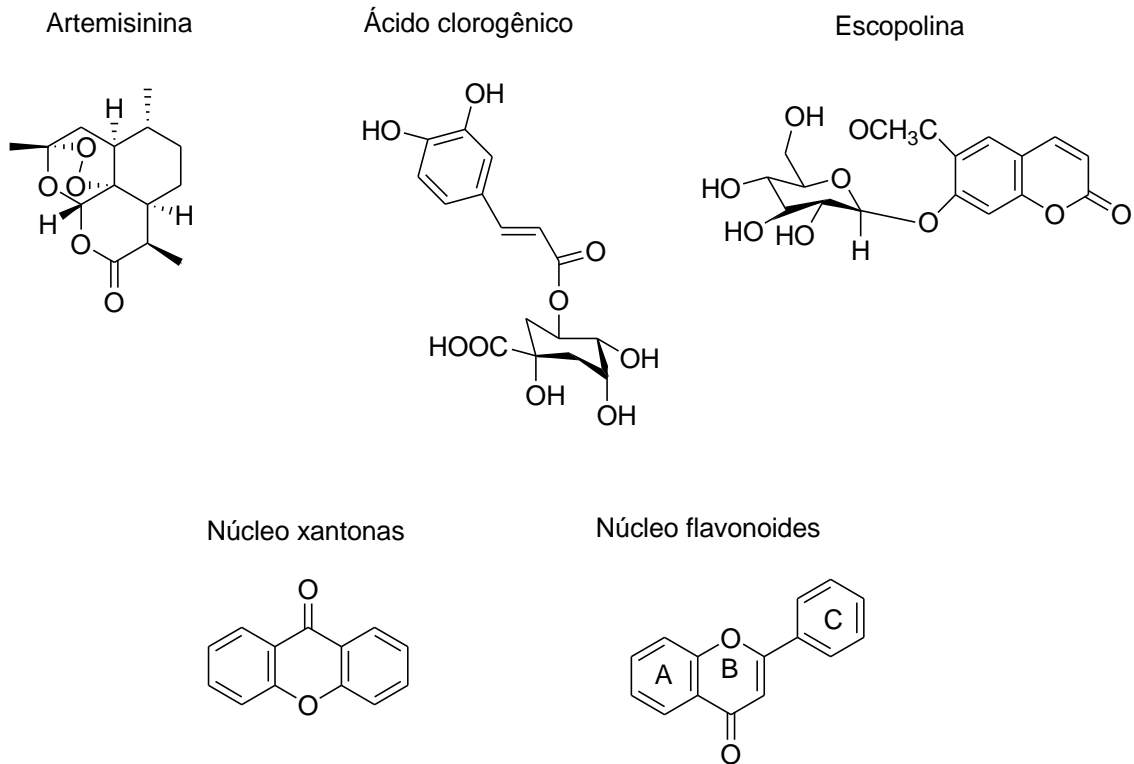
Fonte: Adaptado de GOBBO-NETO; LOPES (2007).

Existem outros estudos que mostram que os metabólitos secundários dos óleos voláteis sofrem variação na composição de acordo com os ciclos circadianos. Por exemplo, foi observada uma variação de mais de 80% na concentração de eugenol no óleo volátil da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), atingindo o seu máximo em torno do meio-dia, horário que é responsável por 98% da composição do óleo volátil. Em contrapartida, a variação atinge uma concentração de 11% no horário 17h56 (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). A temperatura

também pode influenciar a produção de metabolitos secundários na planta, porém, como é um parâmetro que está interligado a outras variações como sazonalidade e altitude, não há muitos estudos sobre a influência direta da temperatura. Outro exemplo notório foi observado em *Artemisia annua*. Após passar por um período de geada, verificou-se um aumento de cerca de 60% dos níveis de artemisinina (Figura 8). Essa substância tem atuação contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, que é agente causador da malária (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Nas folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), foi visto um aumento de quatro até cinco vezes no conteúdo de *escopolina* (Figura 8), ácido clorogênico (Figura 8) após submissão a baixas temperaturas. Outros fatores ainda como fotossíntese, comportamento estomatal, expansão foliar e crescimento podem ser alterados por estresse hídrico, e conseqüentemente, levar alterações na produção de metabolitos secundários. Os efeitos de radiação UV também alteram a produção dos metabólitos secundários. A correlação positiva é que, no caso dos flavonóides e fenilpropanóides, possuem uma proteção contra a fotodestruição, isto é, essas moléculas absorvem e dissipam energia solar, evitando dano a outros tecidos.

Os flavonóides (Figura 8) possuem um papel especial, pois são acumulados em tecidos superficiais (tais como epiderme, subepiderme, pelos, cutícula e material epicuticular), ou seja, são considerados protetores UV-B. Existe um aumento desses metabólitos “protetores solares”, que é controlado pela rota biossintética dos fenilpropanóides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase, entre outras), as quais podem ter sua expressão gênica induzida pela luz. A nutrição do solo é outro fator importante, a menor taxa de crescimento da planta está associada a solos com nutrientes pobres, porém se verifica um aumento na produção de metabólitos secundários nesse caso. Conforme comentado anteriormente, os flavonóides são considerados “protetores solares”, e maiores altitudes tem susceptibilidade à radiação UV, caso descrito para espécies do gênero *Leontodon* na variação total de flavonóides quando a altitude do local de coleta variou entre 30m e 2950m. Estudo com *Swertia franchetiana* matéria-prima para elaboração de um importante medicamento popular conhecido como DiDa no Tibet, utilizado no tratamento de doenças relacionadas ao fígado, mostrou que a partir de altitudes entre 2200m e 3960 m, sofreu alterações de concentrações de algumas xantonas mangiferina e 1,8-diidroxi-3,7-dimetóxi-xantona (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 8-Estruturas químicas de alguns flavonóides encontrados em plantas



Fonte: Adaptado de GOBBO-NETO; LOPES (2007).

2.2 Aspectos Gerais da família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma das maiores famílias botânicas das angiospermas, compreendendo mais de 3 mil espécies em aproximadamente 140 gêneros (BEARDSELL et al., 1993; VASCONCELOS et al., 2015). Os gêneros que se destacam da Myrtaceae são: *Eugenia*, *Acca*, *Myrciaria* e *Psidium* (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). A família Myrtaceae possui diversidade na Austrália, no sudeste da Ásia e na América, mas tem pouca representação na África. A família distingue-se por uma combinação das seguintes características: folhas inteiras contendo glândulas sebáceas, ovário meio inferior, estames geralmente numerosos, floema interno e fossas vestigiais nos vasos do xilema.

Entre todos os gêneros da família Myrtaceae que englobam frutíferas, atualmente apenas quatro gêneros (*Eugenia*, *Acca*, *Myrciaria* e *Psidium*) têm importância econômica (FRANZON et al., 2009). O gênero *Eugenia*, com cerca de 350 espécies no Brasil, é um dos maiores da família, que apresenta ampla distribuição, desde o México, Caribe, até a Argentina (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Nesse gênero, destaca-se como principal espécie a *E.*

uniflora L., conhecida popularmente como pitangueira. São, também, fornecedoras de frutos comestíveis, podendo-se citar *E. involucrata* DC. (cereja-do-mato), *E. pyriformis* Cambess(uvaia), *E. neosilvestres* Sobral (grumixama) (ROMAGNOLO; DE SOUZA, 2006).

No gênero *Acca*, destaca-se como principal espécie a *A. sellowiana* (Berg) Burret, anteriormente identificada como *Feijoa sellowiana* Berg, conhecida como feijoa ou goiabeira-serrana, nativa da América do Sul. Em Santa Catarina, essa espécie ocorre espontaneamente em áreas com altitudes superiores a 1000 metros, mas ainda não é cultivada comercialmente, ao contrário do que ocorre em outras partes do mundo, especialmente na Nova Zelândia, Estados Unidos e Colômbia (DUCROQUET, J.P.H.J., HICKEL, 1997). No gênero *Myrciaria* destacam-se as jaboticabeiras. Esta é uma planta nativa do Brasil, da Mata Atlântica, que vegeta diversos solos, podendo ser encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul (MACEDO-COSTA et al., 2009).

A família Myrtaceae também é conhecida pelo alto conteúdo de óleos voláteis nas folhas de seus indivíduos. Esses óleos são misturas complexas de terpenos C₁₀ e C₁₅ e outros constituintes voláteis, que têm aromas distintos (KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008). Com bases nessas características foi possível, através do banco de dados da EssOilDB (KUMARI et al., 2014), verificar a variação dos terpenos tanto na família Myrtaceae quanto no gênero *Psidium*.

2.3 Gênero *Psidium* e potencial medicinal

A etimologia “*Psidium*” é originária da palavra grega *psídion*, que significa morder, em referência ao sabor agradável dos frutos. Em sua distribuição, o gênero *Psidium* é neotropical (COSTA, 2009) (Caatinga, Cerrado, Campos Rupestres, Florestas Amazônica, Atlântica, Deciduais, Restingas, entre outros). Tem ocorrência do México até Argentina, incluindo oeste das Índias (Ilhas do caribe) e dois arquipélagos no Pacífico. Algumas áreas apresentam uma ampla classe de *habitats*. Aparentemente, existem três centros de diversidade para o gênero *Psidium*: Oeste das Índias, particularmente nas ilhas de Cuba e Hispaniola; Sul do Brasil e Paraguai; e norte da América do Sul, que inclui o Peru, Venezuela, e as Guianas (LANDRUM; KAWASAKI, 1997; SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008).

O gênero *Psidium*, possui cerca de 100 espécies (LANDRUM; KAWASAKI, 1997), e destacam-se pelo seu grande potencial econômico por produzir produtos que são consumíveis na alimentação, e produtos com potencial farmacológico (FRAZON et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017). Na tabela 1 estão as principais espécies do gênero *Psidium* e o seu emprego na

medicina popular ou como uso doméstico. Entre as espécies que mais se destacam é a *Psidium guajava* L. (popularmente conhecida como goabeira (FRAZON et al., 2009), provavelmente pela sua utilização na fabricação de doces, geleias, sucos, consumo *in natura* e a utilização caseira das suas folhas para combater problemas de garganta, diarreia, entre outros. Diversos estudos indicam a presença de óleo volátil nas folhas de *P. guajava*, entretanto, essa composição química pode variar de acordo com a região onde ocorre a coleta. Segundo Lima et al. (2009), a caracterização do óleo essencial por CG-EM de três variedades domésticas e 1 uma silvestre das folhas de *Psidium guajava*, revelou uma variação da composição química entre os cultivares apresentando como majoritários selin-11-en-4- α -ol com 22,19% a 21,46%, 1,8-cineol com 12,83% a 42,68%, trans-cariofileno com 8,24% a 12,08%, e óxido de cariofileno com 2,26% a 9,34%. Um dos componentes mais frequentes da espécie *guajava* L. (ESSOILdB, 2018) é o 1-8-cineol. Segundo Brown et al. (2017), esse composto apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. O óxido de Cariofileno, que tem sido identificado em várias espécies de *Psidium*, tem sido associado a atividade anti-inflamatória (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010), e também possui potencial conservante na indústria de alimentos (CHALANNAVAVAR et al., 2012). Na literatura, o trans-cariofileno tem sido relatado como composto anti-inflamatório e empregado como agente anti-artrítico (VIJAYALAXMI, et al., 2015). Muitas dessas atividades biológicas são atribuídas aos componentes majoritários dos óleos voláteis, pois estão presentes nas folhas em grande quantidade. No entanto, outros metabólitos secundários também podem contribuir para as atividades mencionadas.

Tabela 1-Principais espécies do gênero *Psidium* na região Centro-Oeste do Brasil, seus nomes populares, potencial de usos e áreas de ocorrência

Nome científico	Nome popular	Potencial e indicação de uso	Área de ocorrência
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiabeira	Diarreia, inflamação de garganta, leucorreia, ferimentos, fígado, hemorróidas e desordens menstruais, doces, geleias e sucos	Todo território brasileiro
<i>Psidium firmum</i> O. Berg.	Goiabinha do cerrado	Cicatrizante	Brasil (MG, GO, DF)
<i>Psidium guineense</i> Sw.	Araçá verdadeiro; araçá azedo	Antiinflamatório, fabricação de sorvetes, geleias	Sul do México, ao norte da Argetina, e Brasil
<i>Psidium laruotteanum</i> Cambess	Araçá-cascudo	Fabricação de doces	Brasil (MG, DF, SP, MS, RS, BA)
<i>Psidium myrsinites</i> DC.	Araçá-bravo, araçá-de-veado, araçá-liso	Cicatrização, fabricação de geleias e sucos	Brasil (CE, BA, TO, GO, DF, MG, MA, PI)
<i>Psidium rufum</i> Mart.	Araçá-cagão	Utilizado como curtumes e também como laxante	BA, RJ, e MG
<i>Psidium australe</i> Cambess	Araçá; araçá-de-folha-marrom	Fonte de vitamina C	PR, SC,RS, DF, GO e MG

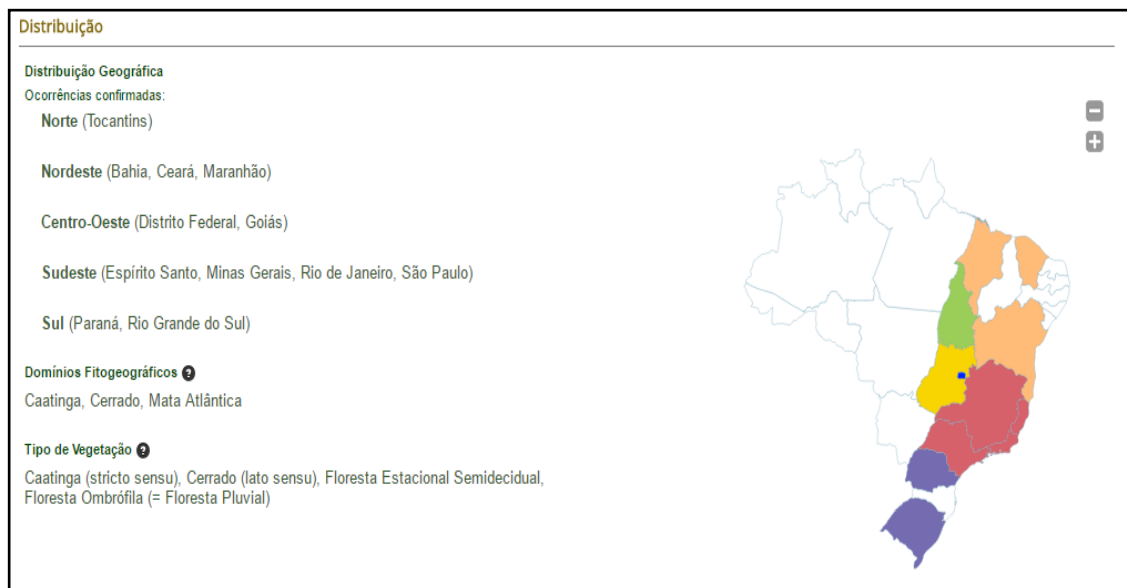
Fonte: FRANZON et al., (2009).

2.4 *Psidium myrtoides* O. Berg

O gênero *Psidium*, como já mencionado, apresenta ampla distribuição no território brasileiro, bem como em outras partes do mundo (FRANZON et al., 2009). A *Psidium myrtoides* O. Berg é popularmente conhecido como araçá-roxo no Brasil. A planta possui outros sinônimos como *Myrtus corynantha* (Kiaersk.), *Corynemyrtus corynantha* (Kiaersk.) Mattos, *Psidium turbinatum* Mattos, *Psidium corynanthum* (Kiaersk.) Burret, *Psidium myrsinoides* O. Berg, *Guajava myrsinoides* (O.Berg) Kuntze, *Guajava myrtoides* (O.Berg) Kuntze (REFLORA, 2018).

Conforme o mapa representado na figura 9, *Psidium myrtoides* encontra-se desde a região Nordeste até Sul. Os domínios fitogeográficos são: Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (REFLORA, 2018). E é uma planta endêmica do território brasileiro (Figura 9).

Figura 9-Distribuição geográfica da *Psidium myrtoides* O. Berg



Fonte: REFLORA (2018).

Apresentam-se como árvores de 6 a 12 metros de comprimento, e às vezes, podem alcançar 20 metros. As cascas do tronco são esfoliantes com lâminas papiráceas. Folhas opostas de tamanho entre 2.5 e 7.5 centímetros. Flor com botão abertos com 4 lobos; frutos verdes quando imaturos e quando maduros tem cor atropurpúreo (Figura 10) (REFLORA, 2018).

Figura 10-Fotografia de um exemplar de *Psidium myrtoides* O. Berg



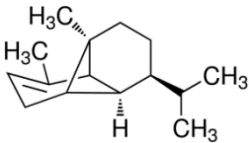
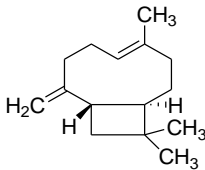
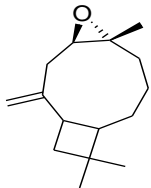
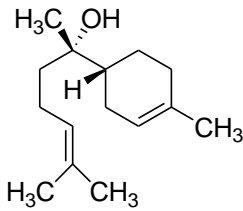
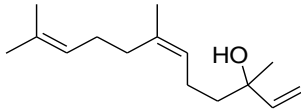
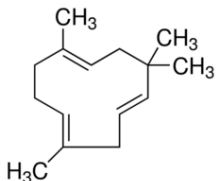
Fonte: A autora (2018).

Composição química e propriedades biológicas foram relatadas recentemente para os óleos voláteis da espécie. Dias et al. (2018) identificou compostos químicos majoritários na *Psidium myrtoides* tais como α -copaeno (7,8%), trans-cariofileno (30,9%), α -humuleno (15,9%), óxido de cariofileno (7,3%), e α -bisabolol (5,3%). Ainda dentro deste contexto, o óleo volátil apresentou atividade antibacteriana, com moderada atividade contra *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus salivarius* e atividade muito promissora contra *Streptococcus mutans*. Outro sinônimo da espécie, a *Psidium myrsinoides*, o óleo volátil das folhas apresentou uma composição química com os seguintes majoritários: trans-cariofileno (22,4%), óxido de cariofileno (19,7%) e α -humuleno (8,4%) (FREITAS, M. O.; ORAIS, S. M. DE; SILVEIRA, E. R., 2002).

Os compostos majoritários presentes na *Psidium myrtoides* apresentam outras propriedades farmacológicas interessantes, podendo a sazonalidade influenciar nessas propriedades. Conforme está representado na tabela 2. O interesse pela exploração do gênero *Psidium* se dá pelas características biológicas que a planta apresenta através de cada constituinte químico.

Na tabela 2, estão apresentados os constituintes mais importantes presentes da *Psidium myrtoides*.

Tabela 2-Alguns dos constituintes químicos mais importantes presente no gênero *Psidium* que apresentam atividade biológica

	Constituinte químico	Estrutura química	Atividade biológica
1	α -Copaeno		Antifúngico (XING et al., 2018)
2	Trans-cariofileno		Antifúngico, anti <i>Trypanosoma cruzi</i> , Anti-leishmania, anti-inflamatório (H.-T. CHANG et al., 2008; ISABELA et al., 2017; IZUMI et al., 2012; KIM; PARK, 2012; OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, 2006; SANTOS et al., 2008)
3	Óxido de cariofileno		Antifúngico, anti-cancerígena, analgésico e anti-inflamatório (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010; H.-T. CHANG et al., 2008; PAN et al., 2016)
4	α -bisabolol		Antituberculose, anti-leishmania (SIENIAWSKA et al., 2018)
5	Trans-nerolidol		Antifúngica (PEREIRA et al., 2018)
6	α -humuleno		Inseticida (BENELLI et al., 2018)

Fonte: A autora (2019).

2.5 Estudos biológicos e farmacológicos dos produtos naturais

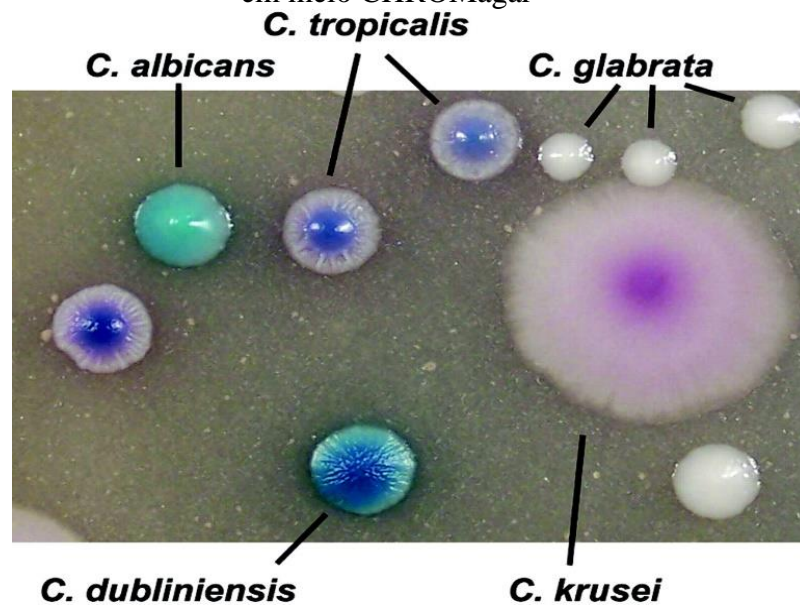
2.5.1 Atividade antifúngica e antibacteriana

Nas últimas décadas, os antimicrobianos de origem vegetal têm chamado atenção, devido à resistência aos antibióticos tradicionais desenvolvida por alguns microorganismos. Então, os produtos naturais começaram se apresentar como alternativa para combater esses microorganismos, pela sua ação terapêutica comumente associada aos óleos voláteis, e também como alternativa para reduzir a suscetibilidade humana aos microorganismos quando são empregados antibióticos convencionais (CREVELIN et al., 2015; SANTOS, 2012).

Candida são leveduras responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas invasivas sistêmicas em humanos. As infecções por *Candida* (Figura 11) tiveram um aumento significativo nos últimos anos, sendo o quarto patógeno mais comum isolado em culturas de sangue nos EUA, e o décimo patógeno mais isolado na Europa. A candidemia é um tipo de infecção com alta morbidade e mortalidade. As taxas relatadas variam entre 30 a 40%, mas podendo as taxas de mortalidade apresentar uma menor variação entre 10 e 49% (MIKULSKA et al., 2012).

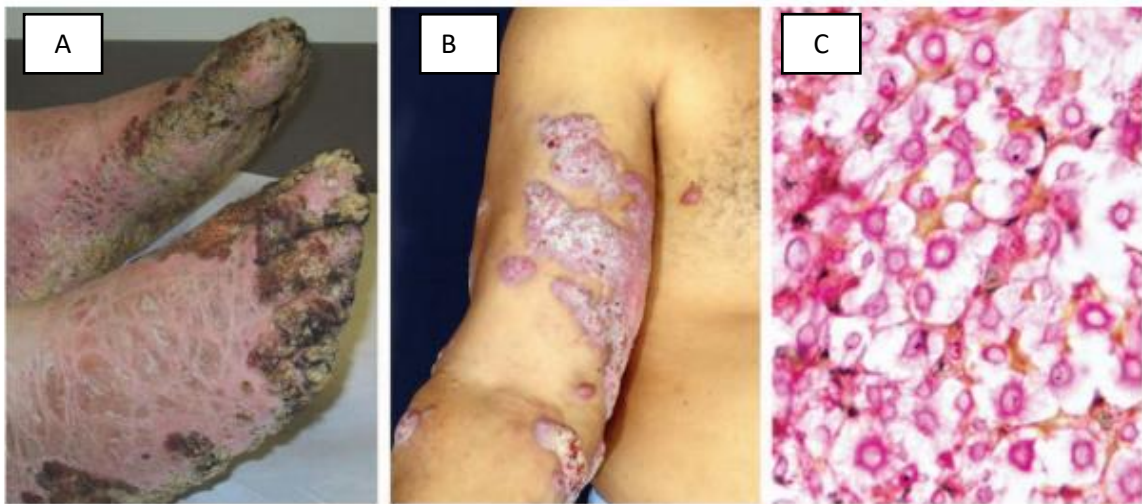
Infecções dos tratos orais e genitais também são comuns, especialmente, a candidíase vulvovaginal (ou aftas). Cerca de 50 a 75% das mulheres em idade fértil sofrem de vulvovaginite (BROWN ET AL., 2012). Conforme descrito na literatura, a *Candida albicans* é a causa mais frequente das espécies de candidíases (BROWN et al., 2012; MIKULSKA et al., 2012), e as que mais apresentam resistência ao antibiótico Fluconazol, são as espécies *Candida glabrata* e *Candida krusei* (MIKULSKA et al., 2012). Na América do Norte e em muitos países europeus, tem sido relatada a diminuição dos casos de *C. albicans*, e um aumento gradual das infecções por *C. glabrata* e *C. tropicalis* (YAPAR, 2014). A figura 12 apresenta alguns casos de infecções fúngicas provenientes de *Candida*.

Figura 10-Colônias de diferentes espécies de *Candida* após crescimento por 48 horas a 37 ° C em meio CHROMagar



Fonte:SAHAND et al. (2005).

Figura 11-Fotografias de Infecções fúngicas



Legenda: Candidíase mucocutânea crônica (A), cromoblastomicose (B), e histologia corada com mucicarmina do cerebelo de um paciente com AIDS que morreu de meningoencefalite criptocócica (C) (demonstrando uma abundância de fungos corados de ro).

Fonte: BROWN et al.(2012).

Pessoas portadoras de HIV também estão mais sujeitas a infecções por *Candida*, o que representa 10 milhões de casos adicionais de candidíase oral e 2 milhões de casos de infecções fúngicas esofágicas. As infecções orais também são comuns em pacientes de próteses dentárias, em pacientes que utilizam esteróides inalatórios para asma, com leucemia, e em pacientes que utilizam a radioterapia para câncer de cabeça e pescoço (BROWN et al., 2012). E, ainda de acordo com Brown e colaboradores (2012), as pessoas morrem mais com alguns tipos de fungos invasivos (Exemplo: *Candida albicans*) do que por tuberculose ou malária.

Outros microorganismos, tidos como patógenos periodontais possuem capacidade de implantar-se no sulco gengival. É o caso das bactérias acidogênicas e acidúricas que aderem à superfície do dente, formando um biofilme bucal (caso da cárie dentária). Para minimizar os casos de periodontite, tem se desenvolvido estudos para barrar a formação desses microfílmes formados na superfície do dente. A clorexidina é um agente antibacteriano efetivo testado, e existem outros que são: fluoretos, derivados de fenol, ampicilina, eritromicina e penicilina. No entanto, o uso exacerbado desses compostos pode perturbar a flora bucal, causar suscetibilidade como vômito e diarreias. Para encontrar uma alternativa que não prejudique a flora bucal e combata as bactérias da cárie mais efetivamente. Os pesquisadores tem optado por estudar os produtos naturais e sua ação antimicrobiana (CREVELIN et al., 2015).

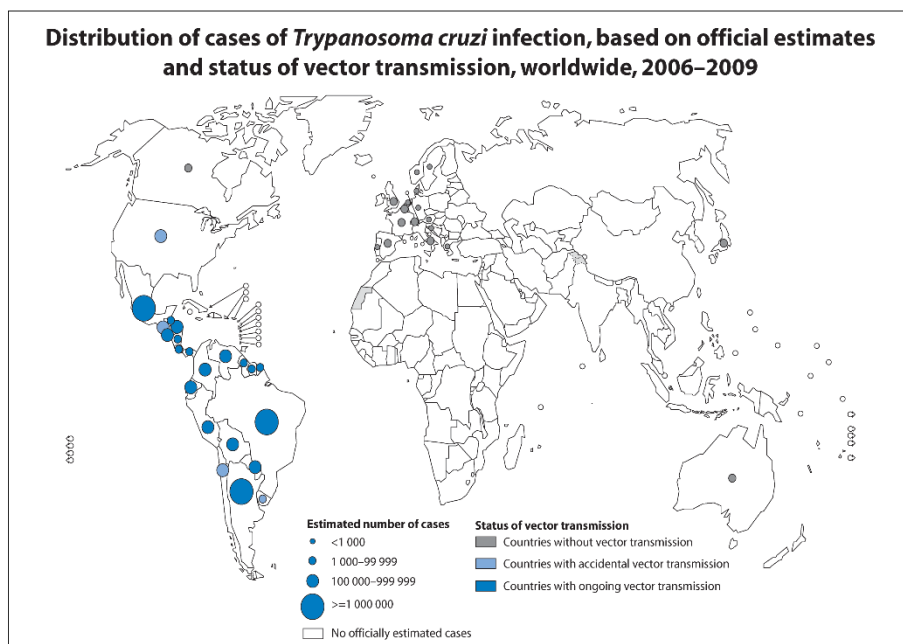
A atividade antimicrobiana de extratos vegetais e óleos voláteis pode ser avaliada através da determinação de uma pequena quantidade dessas substâncias extraídas de alguma parte da planta, necessária para inibir o crescimento do microorganismo. Para esse teste de atividade dá-se o nome de teste de susceptibilidade. A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e infecções oportunistas fatais, como em casos de infecções por vírus HIV e em pacientes em tratamento quimioterápico. Além disso, a importância do estudo com óleos voláteis ocorre para exploração de novos agentes biológicos, e no Brasil é bastante atraente esta exploração das plantas medicinais pela imensa biodiversidade que o país apresenta (OSTROSKY et al., 2008).

2.5.2 Doenças negligenciadas e o seu impacto mundial

A triponossomíase americana, conhecida como doença de Chagas, foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas, então pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz –FIOCRUZ –RJ. Essa infecção parasitária é transmitida pelo inseto barbeiro, quando infectado pelo *Trypanosoma Cruzi*. Um dos vetores da doença de Chagas é o *Triatoma infestans* considerado a principal espécie vetora do *Trypanosoma cruzi*, parasito causador da doença de Chagas (ARGOLO et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina, estão infectadas com o *Trypanosoma cruzi*. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

De acordo com a figura 13, podemos visualizar através do mapa de distribuição de casos em que a doença de Chagas é um reflexo dos países subdesenvolvidos, apresentando elevada mortalidade em países endêmicos, incluindo o Brasil (DIAS et al., 2016).

Figura 12-Distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, baseado na estimativa oficial e estado de transmissão do vetor, 2006-2009



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization

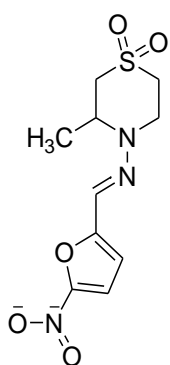


Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010).

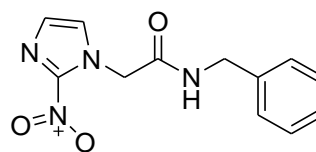
Os estágios da infecção parasitária em humanos estão diretamente ligados à forma do ciclo de vida do protozoário e podem ser divididos em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda pode durar mais tempo para ser diagnosticada, geralmente, durando de 4 a 10 dias, e pode apresentar manifestações clínicas tais como: febre, mal-estar e falta de apetite. Os sinais mais característicos da fase aguda são o chagoma (inchaço na região da picada), e o sinal Romana (inchaço das pálpebras). Já na fase crônica, a doença se manifesta quando o coração está comprometido (ARGOLO et al., 2008).

Os primeiros fármacos promissores para tratamento da doença de Chagas foram introduzidos no Brasil, e em outros países, como foi o caso dos nitrofuranos (nifurtimox, por exemplo) e nitroimidazóis (benznidazol, por exemplo) (Figura 14). No entanto, essas duas últimas drogas mostram efeitos colaterais, e os indícios de cura são em torno de 80% para os casos agudos, e poucos expressivos para os casos crônicos (COURA, 1997), apresentando, portanto, limitações para sua aplicabilidade (SOBRINHO et al., 2006). A ação antiparasitária destes fármacos é atribuída à formação de radicais livres, formados pela ação de enzimas nitroredutases (FONTES et al., 2017). Com isso, o Nifurtimox® teve a sua comercialização interrompida no Brasil, pois além de apresentar efeitos colaterais, as cepas de *T. cruzi* apresentaram resistência, desta forma, os laboratórios farmacêuticos demonstraram desinteresse em continuar a produção de um medicamento que não era lucrativo (SOBRINHO et al., 2006).

Figura 13-Estruturas químicas do Nifurtimox e Benznidazol



Nifurtimox



Benznidazol

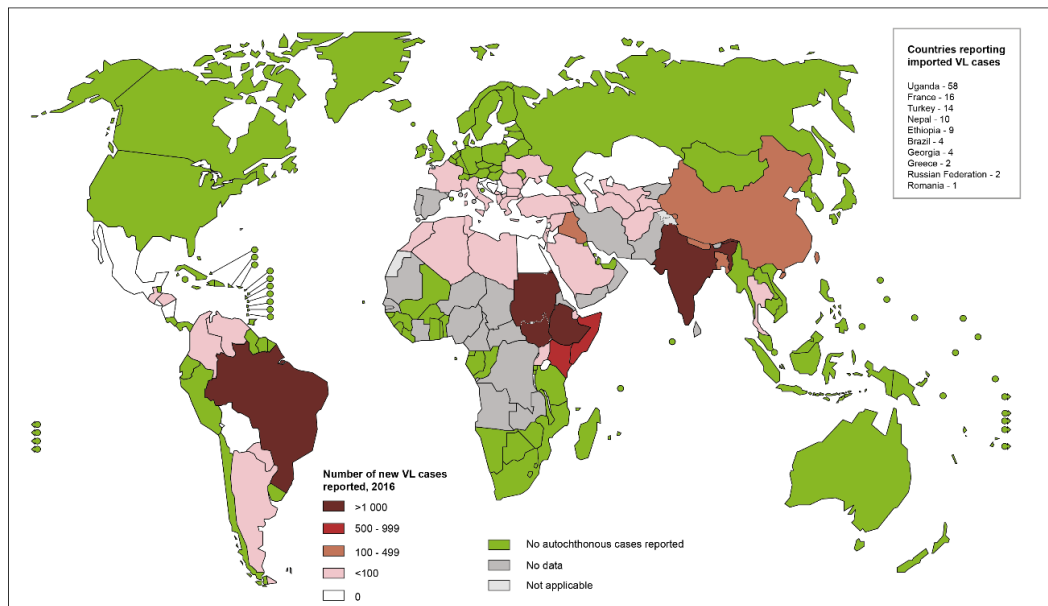
Fonte: A autora (2019).

O desenvolvimento de novas alternativas de fármacos para combater a doença de Chagas ficou sem novidades por alguns anos. Novos compostos começaram a surgir com o advento das pesquisas com produtos naturais, que foi fundamental para promover a identificação de alvos moleculares no protozoário, tais como metabolismo de enzimas, que também são responsáveis pelo crescimento celular em seres unicelulares. Por exemplo, como é o caso dos fungos, o ergosterol, também é o principal esterol presente no *T. cruzi*. Então, existe um interesse no desenvolvimento de fármacos que sejam capazes de inibir a enzima 14 α -esterol, responsável pelas fases aguda e crônica da doença (FONTES et al., 2017).

Outra doença negligenciada é a leishmaniose. A leishmaniose é uma doença crônica grave, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença é típica de regiões tropicais e subtropicais, sendo os principais agentes etiológicos *Leishmania chagasi*, *Leishmania infantum*, e *Leishmania donovani*, e aparecendo em alguns países da Ásia, África e região do Mediterrâneo. Também está concentrada na América Central, na América do Sul e no sul do Texas (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; FONTES et al., 2017). A doença apresenta-se de duas formas: cutânea (ataca a pele e a mucosa), e visceral (acomete órgãos internos), e esta última é considerada a mais perigosa pois, associada com casos de desnutrição, é fatal ao homem (FONTES et al., 2017). Conforme a figura 15, é possível visualizar que os casos de leishmaniose visceral acometem principalmente os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

Figura 14-Estado de endemicidade da leishmaniose visceral em todo mundo, 2016

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2016



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2016. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Legenda do mapa- Nas Regiões marrom à bege: Casos de pessoas com leishmaniose que estão entre >1000 e <100. Nas Regiões em verde: Não há casos de pessoas com a doença na região (ou território); Nas regiões em cinza: Casos da doenças sem data; Nas regiões em cinza claro: Não se aplica.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016).

A OMS estima que a leishmaniose seja a segunda doença transmitida por insetos que mais causa óbito no mundo. Existem duas espécies principais que transmitem a leishmaniose visceral. São elas: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. O ciclo da doença apresenta o inseto (vetor transmissor), transmitindo o parasita na forma promastigota ao picar o hospedeiro. Já na corrente sanguínea, a célula inicia a fagocitose da forma promastigota. Dentro da célula, o parasita se transforma na forma amastigota e sofre divisão binária. Depois de algum tempo, o parasita causa a lise da célula e vai infectando outras células, momento o qual o paciente começa a exibir os sintomas. O ciclo se concretiza quando o inseto ingere o sangue contaminado. Dentro do mosquito, os parasitas na forma amastigota são transformados novamente na forma promastigota, onde novamente podem infectar outros hospedeiros (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017) .

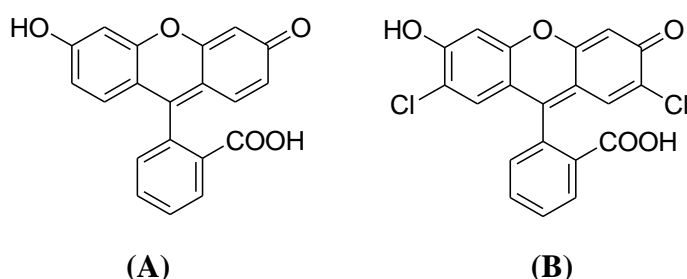
A manifestação clínica da leishmaniose ocorre com um espectro muito grande de sintomas, desde o não aparecimento até a forma letal. Um dos principais fármacos utilizados está demonstrado na figura 16. É a Anfotericina B ($CI_{50} = 0,04\mu M$), um antifúngico isolado da

2.5.3 Atividade antioxidante (ORAC)

Os compostos antioxidantes que são obtidos a partir de fontes naturais têm ganhado grande importância na prevenção de reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal. Os agentes antioxidantes podem prevenir a formação de radicais livres envolvidos em processos oxidativos (BROINIZI et al., 2007).

O método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) é um ensaio que avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação de determinado composto. É relevante para as condições *in vivo* porque ele usa uma fonte de radical livre biologicamente, o radical peroxil (PRIOR, 2015), sendo uma ferramenta muito importante que auxilia na busca por substâncias bioativas. O método se baseia na propriedade fluorescente dos indicadores B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE) (Figura 17). No ensaio, o radical peroxila (oxidante encontrado em sistemas biológicos), gerado pela reação do AAPH [Dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] com oxigênio do ar, reage com o indicador fluorescente para formar uma espécie que não emite fluorescência. Esta espécie química pode ser medida por espectrometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm (B-PE) e 578 nm (R-PE). O ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida do radical peroxila, por transferência de átomos de hidrogênios (ALVES et al., 2010).

Figura 16- Estrutura da fluoresceína (A) e diclorofluoresceína (B)



Fonte: A autora (2018).

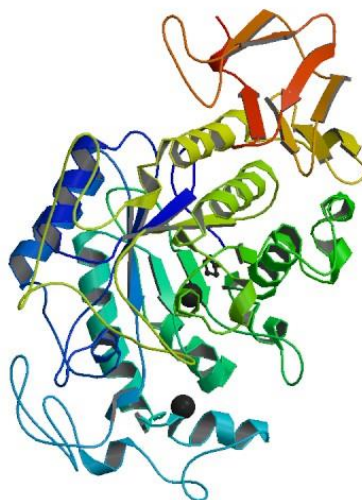
2.5.4 Avaliação enzimática

As α -amilases (Glucan 1,4- α -glucosidase) são um grupo de enzimas produzidas por animais, plantas e microrganismos, e são responsáveis por promover a hidrólise das ligações glicosídicas de carboidratos à monômeros (PAYAN, 2004).

O amido é um polissacarídeo armazenado em várias plantas sob a forma de carboidrato como reserva nutritiva, e é constituído por dois componentes principais: Amilose e amilopectina (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005). A amilose é um polímero linear de moléculas de glucose unidas por ligações α -1,4glicosídicas e a amilopectina é um polímero ramificado, possuindo cadeias principais de glucoses unidas por ligações α -1,4 interligadas por ligações α -1,6 (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005).

Consequentemente, muitas enzimas necessitam promover a “quebra” das cadeias poliméricas do amido, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos de cadeia, como exemplo, dextrinas, maltose, maltotriose, e oligossacarídeos ramificados de 6 a 8 unidades de glucose, que possam ser absorvidas pelo organismo dos seres vivos (WHITCOMB; LOWE, 2007). As enzimas que estão envolvidas neste mecanismo de ação são: endo-amilases, exo-amilases e enzimas de desramificação (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005). A alfa-amilase salivar (Figura 18) é uma importante enzima presente na saliva humana, desempenhando um papel na digestão inicial do amido e pode estar envolvida na colonização de bactérias formadoras de placas dentárias.

Figura 17- Estrutura tridimensional da α -amilase da saliva humana



Legenda: O íon Ca^{+2} e o íon Cl^{-} são esferas pretas.

Fonte: PROTEIN DATA BANK (2018).

As enzimas α -amilase e α -glucosidase são responsáveis pela quebra dos oligossacarídeos e dissacarídeos a monossacarídeos, isto é, a inibição destas enzimas leva a uma diminuição do nível de glicose no sangue, porque os monossacarídeos são a forma de carboidratos a serem absorvidos, conseqüentemente, principal estratégia para o tratamento de diabetes (FUNKE; MELZIG, 2006).

A OMS vem destacando o impacto que o diabetes tem sobre as famílias, e o papel dos membros da família no apoio à prevenção. A estimativa apontada pela organização é que 400 milhões de pessoas vivem com diabetes em todo o mundo. A doença pode levar à cegueira, insuficiência renal, ataque cardíaco, derrame, e amputação de membros inferiores. Em 2006, a diabetes chegou a ser a sétima causa principal de morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Alguns medicamentos estão disponíveis para inibir a atividade enzimática das enzimas α -amilase e α -glucosidase como por exemplo, a acarbose. A acarbose é utilizada no tratamento de diabetes, porém, a sua utilização apresenta efeitos colaterais. Sendo assim, é necessário explorar outras alternativas de baixo custo para encontrar novas moléculas capazes de promover a inibição dessas enzimas (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Já as lipases (Figura19) são enzimas responsáveis pela digestão da gordura da dieta humana. Tanto pâncreas como o estômago produzem lipases responsáveis pela quebra dos triglicerídeos e fosfolipídios. Uma das importantes classes de lipídios são os triglicerídeos (TGs), que representam um grupo heterogêneo de biomoléculas insolúveis em água e altamente solúveis em solventes orgânicos (p. ex., clorofórmio). Eles constituem a estrutura básica dos fosfolipídios e esfingolipídios, que são componentes de todas as membranas biológicas (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2017). As lipases humanas podem ter duas origens: Pré-duodenais (linfa e gástrica); e extra-duodenais (pancreática, hepática, lipoproteicas, etc).

Figura 18- Estrutura tridimensional da lipase pancreática humana

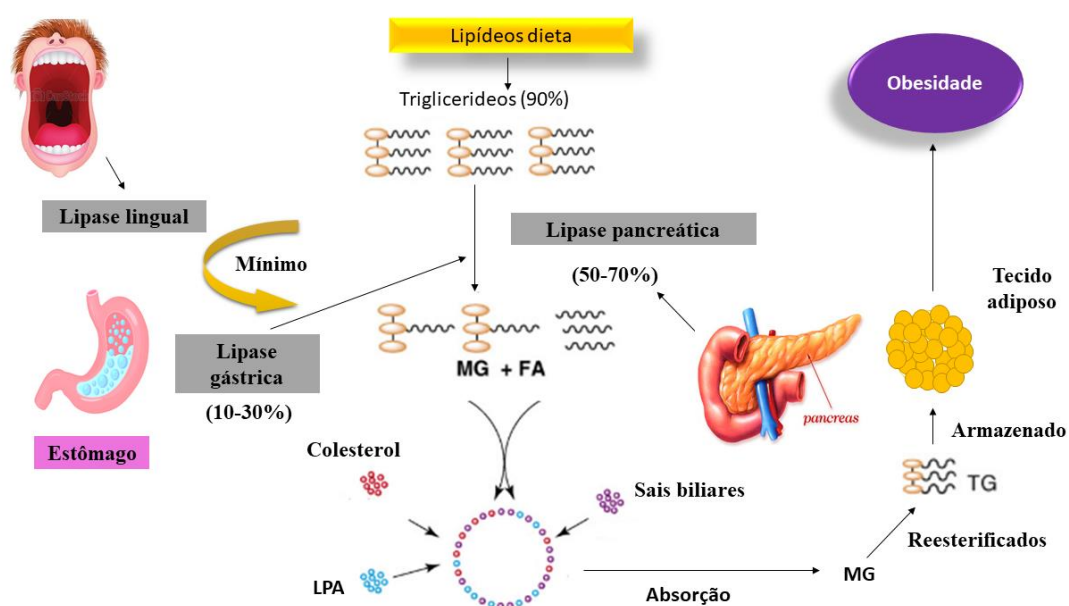


Legenda: O íon cálcio (esfera preta) e ligante ácido metoximecosfosfínico (ligante representado por bola e bastão em preto e vermelho) são mostrados na vizinhança do centro catalítico da enzima.

Fonte: PROTEIN DATA BANK (2018).

Tanto a lipase pancreática como a gástrica desempenham papel fundamental na digestão de triglicerídeos, pois removem os ácidos graxos na posição α e α' , liberando na forma de ácidos graxos livres e β -monoglicerídeos, sendo responsável pela hidrólise de 50 a 70% do total de gorduras alimentares. A figura 20 mostra a atuação fisiológica da lipase no organismo humano (BIRARI; BHUTANI, 2007).

Figura 19-Papel fisiológico das lipases na absorção de lipídios



Legenda: Gorduras são principalmente compostas por triglicéridos mistos (90%) (TGs) e são necessariamente hidrolisados para a sua absorção. Das várias lipases, **LP** é responsável pela hidrólise de 50%-70% das gorduras ingeridas na dieta aos seus respectivos ácidos graxos (**FA**) e monoglicéridos (**MG**). Os MGs e FA formam micelas mistas com os sais biliares, colesterol e ácido lisofosfático, que são absorvidos nos enterócitos, ocorrendo a resíntese de TGs que são armazenados nos adipócitos como principal fonte de energia.

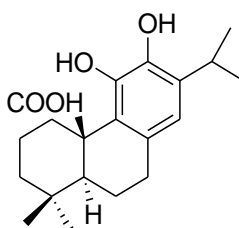
Fonte: Adaptada de BIRARI; BHUTANI (2007).

Quando o metabolismo lipídico está em desequilíbrio pode causar obesidade, e isto está relacionado a associação dos monoglicéridos com ácidos graxos e sua combinação com colesterol, sais biliares e ácido lisofosfático, que são absorvidos e armazenados na forma de triglicéridos, provocando acúmulo de gordura no organismo. Quando ocorre este armazenamento de gordura nos tecidos há o desenvolvimento de uma variedade de doenças graves, que inclui aterosclerose, hipertensão e diabetes (BIRARI; BHUTANI, 2007).

A principal forma de combate ao diabetes é o desenvolvimento de novos inibidores da lipase. Como há uma crescente busca por compostos bioativos e agentes antiobesidade, existe uma boa perspectiva com o estudo de recursos naturais à base de plantas medicinais com respeito à inibição enzimática da lipase (BIRARI; BHUTANI, 2007).

Na literatura, o ácido carnósico (Figura21) apresentou-se como um excelente terpeno inibidor da lipase com uma concentração-dependente expressa no valor de IC_{50} de 12 mg/ml (36 mM) (BIRARI; BHUTANI, 2007).

Figura 20-Estrutura do ácido carnósico encontrado nas folhas de *Salvia officinalis*



Fonte: Adaptado de BIRARI; BHUTANI, (2007).

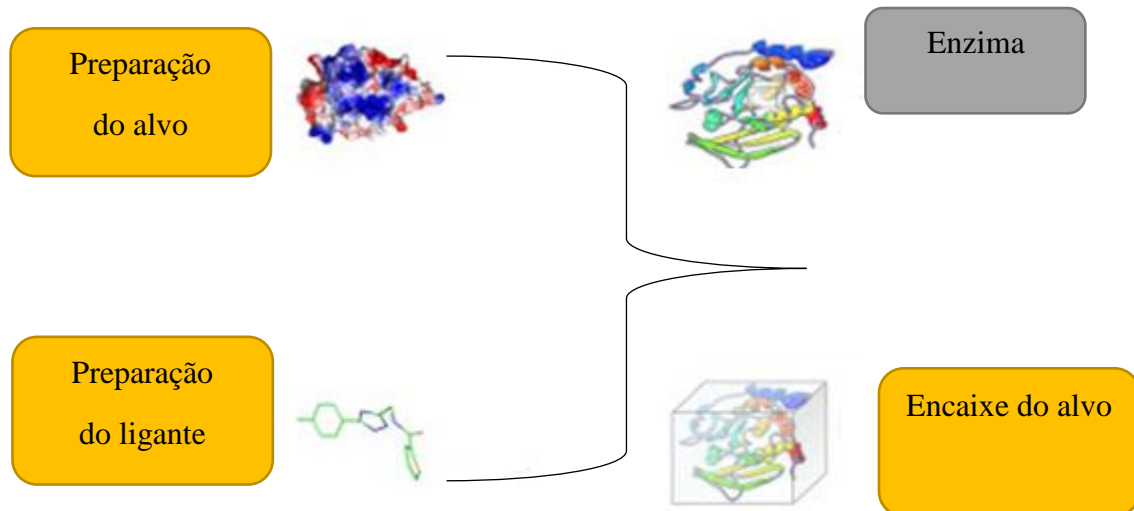
2.5.5 Modelagem molecular

A Modelagem molecular tornou-se uma ferramenta aliada na pesquisa farmacêutica, e foi desenvolvida com intuito de auxiliar pesquisadores a encontrar novos agentes com perfil de atividade biológica.

A abordagem de “docking” molecular pode ser usada para modelar a interação entre uma pequena molécula e uma proteína no nível atômico, o que nos permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação da proteína alvo, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais. O processo de acoplamento envolve duas etapas básicas: a previsão da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro desses locais (usualmente referida como pose) e a avaliação da afinidade de ligação. (MENG et al., 2011).

A figura 22 mostra um esquema genérico de interação entre receptor e o ligante (inibidor) realizada com a utilização de ferramenta de bioinformática e que propicia o “docking” molecular.

Figura 21- Esquema de interação do fármaco (ligante) com sítio da enzima

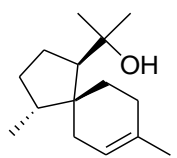


Fonte: Adaptado ÁLVAREZ-CARRETERO et al. (2018).

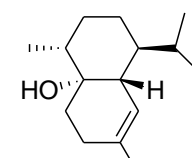
Existem muitas investigações *in vitro* indicando a capacidade de vários triterpenos derivados de plantas inibirem a atividade da α -glucosidase e α -amilase (NAZARUK; BORZYM-KLUCZYK, 2015). O estudo de NAZARUK e BORZYM teve como objetivo identificar quais os compostos químicos terpênicos presentes no óleo volátil da *Sabina chinensis* cv. O. Kaizuca (SCK), uma variante de *S. chinensis* L., seriam responsáveis pela atividade inibitória da enzima alfa-amilase. Os compostos identificados por CG-EM foram acoplados com a alfa-amilase através da modelagem molecular individualmente, usando o software *Autodock 4.0* de acesso livre. Entre estes compostos, o γ -eudesmol exibiu a menor energia de ligação (-6,73 kcal/mol), seguido por α -copaen-11-ol (-6,66 kcal/mol), cubedol (-6,39 kcal/mol) e α -acorenol (-6,12 kcal/mol) (NAZARUK; BORZYM-KLUCZYK, 2015). Os resultados indicaram que estes compostos foram os componentes ativos responsáveis pela atividade inibitória da α -amilase do óleo volátil da SCK, isto é, os que apresentaram menor energia ligação foram também aqueles que apresentaram maior potencial de inibição da enzima em ensaio *in vitro*, como está representado na tabela 3 e na figura 23.

Tabela 3- Resultados dos estudos de docking de α -amilase com os quatro compostos ativos do óleo essencial de SCKL

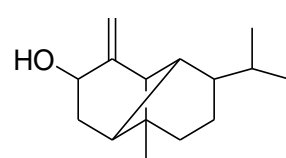
	Compostos	Energia de ligação (kcal/mol)	Constante de inibição ensaio in vitro (μM)
1	α -acorenol	-6,12	32,87
2	cubedol	-6,39	20,84
3	α -copaen-11-ol	-6,66	13,15
4	γ -eudesmol	-6,73	11,67



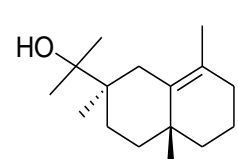
1



2



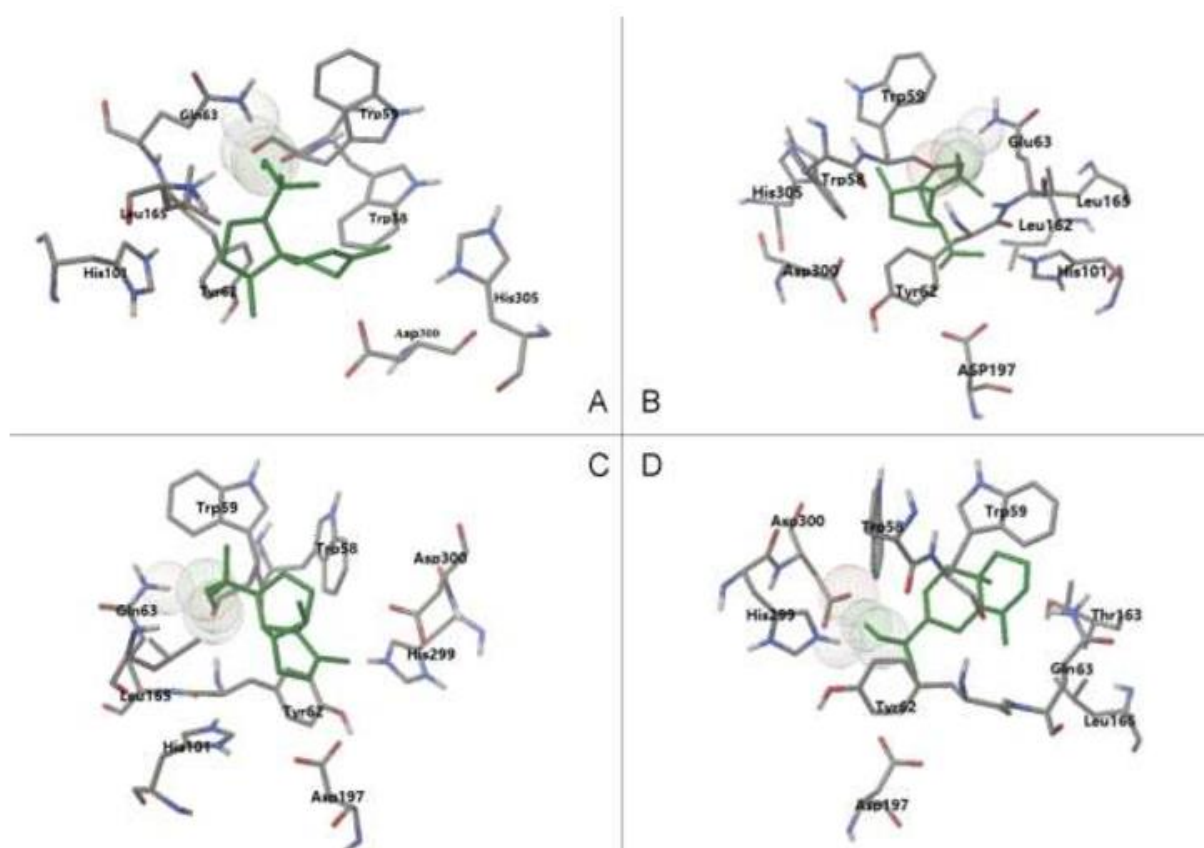
3



4

Fonte: Adaptado de GU et al. (2018).

Figura 22-Visualização da interação da α -amilase e dos compostos ativos no óleo essencial de SCKL



Legenda: (A) α -acorenol, (B) cubedol, (C) α -copaen-11-ol, (D) γ -eudesmol.

Fonte: Adaptado de GU et al. (2018).

O desenvolvimento de drogas terapêuticas ainda é um processo lento. Apesar disso, vários candidatos a novos fármacos têm sido estudados através do planejamento de fármacos, a partir de novas estratégias de modelagem molecular e triagem virtual de bibliotecas de compostos químicos por análise de *docking*. A simulação através do *docking* pode ser uma ferramenta muito útil, que possibilita a identificação mais barata de candidatos a medicamentos promissores para serem testados (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010).

O que permitiram estas estratégias computacionais foi a conclusão do projeto do genoma humano, e a partir disto, os alvos terapêuticos começaram a ser descobertos e elaborados para produção de drogas. Atrelado a isto, as técnicas de purificação de proteínas de alto rendimento, cristalografia, e espectroscopia de ressonância magnética foram desenvolvidas, e contribuíram para aprimorar as estruturas de proteínas e complexos proteína-ligante (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010). Relacionando estas descobertas à abordagem de *docking* molecular foi possível reunir através da Química computacional a previsão da interação entre uma molécula (ligante) e uma proteína a nível atômico, permitindo uma formulação do comportamento receptor-ligante. O processo de ancoramento envolve duas etapas básicas:

1. A previsão da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro dos locais da enzima (usualmente referida como *pose*);
2. A avaliação da afinidade pelos sítios (resíduos aminoácidos) da enzima. Essas duas etapas estão relacionadas aos métodos de amostragem conformacional em que inúmeras conformações ancoradas são exploradas para prever uma conformação mais aproximada do sistema biológico (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010).

No banco de dados *Protein Data Bank* (<<http://www.rcsb.org/pdb/>>) são feitas as seleções das enzimas para o estudo de ancoramento.

A simulação de *docking* do presente trabalho foi realizada pelo software *ArgusLab*, que é de livre acesso para plataforma Windows, e um dos softwares bem utilizados e mencionados na comunidade científica. Este programa é desenvolvido para fins de modelagem molecular, e fornece-nos análises de construção molecular, e a capacidade de realizar vários cálculos moleculares. (TANGUENYONGWATANA; JONGKON, 2016). O *ArgusLab 4.0* é um programa que tem uma interface gráfica fácil de usar. Significa que ele pode ser empregado como uma ferramenta muito eficaz de ensino capaz de demonstrar o encaixe molecular para iniciantes nessa área (JOY, S., NAIR; R.; PILLAI M.R., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ❖ Investigar a composição química e as atividades biológicas do óleo volátil das folhas de *Psidium myrtoides* O. Berg, Myrtaceae.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar quimicamente o óleo volátil obtido das folhas por CG-DIC e CG-EM.
- ❖ Avaliar o desempenho do óleo volátil nos ensaios de atividade antioxidante (ORAC), antifúngica, antiprotozoária, antibacteriana, no seu potencial de citotoxicidade e no seu potencial de inibição enzimática.
- ❖ Avaliar a influência da sazonalidade na composição química do óleo volátil nas épocas de seca e chuva, e avaliar o seu impacto nos resultados das atividades biológicas.
- ❖ Realizar experimentos de docking molecular entre a enzima α -amilase salivar e os candidatos a inibidores para detectar componentes com maior probabilidade de serem responsáveis pela inibição da enzima.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e equipamentos

O Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPEen) - IQ/UFU conta com alguns reagentes e equipamentos, os quais foram utilizados no experimento:

Tabela 4-Reagentes e materiais utilizados

Reagentes	Marca
Trans-cariofileno	Sigma-aldrich
Óxido de cariofileno	Sigma-aldrich
Padrão de alcanos C₈-C₃₀	Sigma-aldrich

Equipamentos	Marca
Balança de Infravermelho	QUIMIS/ modelo Kett-FD600
CG-EM	Shimadzu QP2010
CG-DIC	Shimadzu modelo 2014

Fonte: A autora (2019).

4.2 Coleta do material vegetal

Psidium myrtooides O. Berg (Figura 24), foi coletada no Jardim Indaia na cidade de Uberlândia (18° 56'45.3"S e 48° 16'08.4"W), Estado de Minas Gerais, Brasil, em setembro de 2017 às 11:00 a.m, e em fevereiro de 2018 às 11:00 a.m. As duas temporadas de coleta tiveram como objetivo avaliar o óleo volátil extraído nessas duas estações climáticas, com intuito de comparar as composições químicas e avaliar a ação contra os microorganismos testados. A autorização de coleta da planta pelo CNPq/Sisgen possui o código A1247B0, e a excicata foi depositada na Universidade Federal de Uberlândia onde está registrada com o código de coleta HUFU65831.

Figura 23-Fotografias da planta *Psidium myrtoides* O. Berg (Araçá-roxo) utilizada neste estudo



Legenda: Árvore situada, no Jardim Indaia, da *Psidium myrtoides* O. Berg (A); detalhe das folhas de *Psidium myrtoides* O. Berg (B).

Fonte: A autora (2018).

4.3 Determinação da umidade das folhas

A umidade das folhas foi determinada pelo método gravimétrico através de uma balança de luz infravermelha (Figura 25). A análise foi realizada com cerca de 1,0 g de material vegetal sob temperatura de $105 \pm 5^\circ\text{C}$, até que o teor de umidade permanecesse constante. Para obtenção dos óleos voláteis foram avaliadas as folhas frescas e as folhas secas por 72 horas à temperatura ambiente.

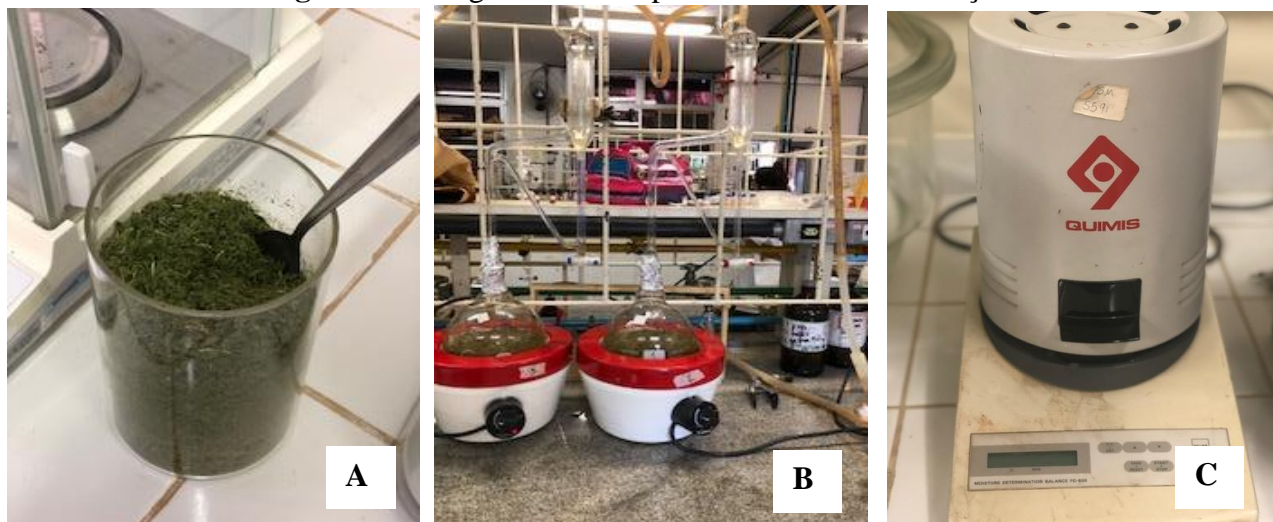
4.4 Extração do óleo volátil

A extração do óleo volátil foi realizada em um aparelho de Clevenger (Figura 25). Em um balão de 2,0 L de fundo redondo, foi adicionado 100 g de folhas trituradas (Figura 25) de araçá-roxo, e 1000 mL de água destilada com auxílio de um funil, em seguida, foi adaptado ao balão o aparelho de Clevenger. A hidrodestilação foi realizada com duas amostras de folhas: folhas frescas, e as folhas secas à sombra por 72 h. O sistema ficou 4 horas hidrodestilando, após esse período a fração do óleo volátil foi coletada do sistema, e transferida para um funil de separação, para ser extraído com diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e secas pela adição de sulfato de sódio anidro. Em seguida, o óleo volátil obtido ficou na chapa à 35°C até a completa evaporação do diclorometano. A extração foi realizada em triplicata, e ao término de cada extração, o rendimento do óleo volátil foi calculado com base na equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa de óleo obtida (g)} \times 100}{\text{material de partida descontando a umidade}}$$

Equação 1.

Figura 24-Fotografias das etapas do Processo de extração



Legenda: Folhas da planta *P. myrtoides* triturada (A); Aparelho de Clevenger utilizado na extração do óleo essencial da *P. myrtoides* O. Berg (B); Balança Infravermelho para medida de umidade (C).

Fonte: A autora (2018).

4.5 Caracterização e métodos: Análise do óleo volátil

A caracterização química do óleo volátil obtido foi realizada no *Departamento de Engenharia Química, DENQ/UFU*. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) (Shimatdzu QP2010). Uma coluna capilar foi utilizada sob as seguintes condições: (i) OV-5 (30m x 0.25mm x 0.25mm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA), o forno programado de 60°C a 246° a 3°C min⁻¹. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas a 240°C e 220°C, respectivamente, com modo split de injeção 1:20, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1mL min⁻¹. A determinação da composição química do óleo volátil foi realizada a partir da comparação dos dados de fragmentação das substâncias com as existentes no banco na literatura especializada (ADAMS, 2007). A identificação dos compostos químicos presentes no óleo volátil foi realizada de acordo com os espectros de massas obtidos nas análises e comparados com os de bibliotecas presentes no software *Labsolution-CG-MS solution*. A comparação foi realizada entre os padrões de fragmentação mostrados pela biblioteca do software e do composto analisado. O equipamento mostra um índice de similaridade,

resultante da comparação entre os espectros dos compostos sugeridos pelas bibliotecas. Nessa análise, para a identificação dos compostos foi considerado apenas aqueles índices de similaridade com valores superiores a 90%. Em seguida, foi realizado um cálculo do parâmetro chamado de índice aritmético (IA) que correlaciona o tempo de retenção dos compostos analisados aos de alcanos (Apêndice B). Para expressar os componentes químicos do óleo volátil em termos de % relativo foi utilizado o CG-DIC (Shimadzu, GC2014), contendo uma coluna tipo Supelco- SPB5 (30m x 0,25mm x 0,25 µm), e foi utilizado nos mesmos parâmetros (split, temperatura coluna, fluxo do gás de arraste, etc) aplicados para o CG-EM.

4.6 Propriedades farmacológicas do óleo volátil da *Psidium myrtoides*

4.6.1 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* (ORAC)

As amostras do óleo volátil foram diluídas em DMSO na concentração de 20 µg,mL⁻¹. Neste ensaio, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75,0 mmol L⁻¹, e pH 7,4. Inicialmente, 25,0 µL de óleo volátil foram misturados a 150,0 µL de fluoresceína (0,085 mmol L⁻¹), e incubados à temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida, 30,0 µL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-idrocloro (AAPH) foram adicionados para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nmex/528nmem) foi medida em espectrofluorímetro e verificada a cada 1,5 min. durante 90 min. O controle (branco) foi realizado substituindo o óleo volátil por tampão fosfato. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O decaimento de fluorescência da fluoresceína foi determinado, utilizando o cálculo da área da amostra subtraída pela área do branco, e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como equivalente de Trolox µmol por grama de amostra.

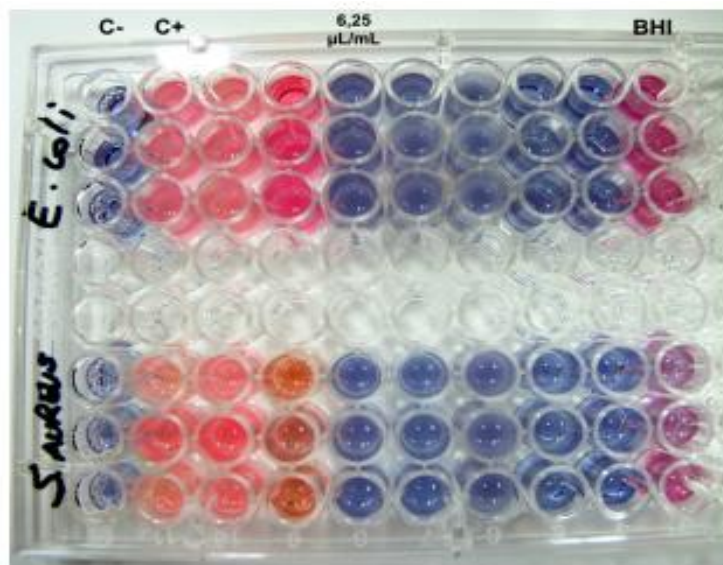
4.6.2 Determinação da atividade antibacteriana

As análises antibacterianas foram realizadas pela Universidade de Franca (SP), e pelo Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (MG), em Patos de Minas. Foi utilizado o método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) utilizando para as bactérias anaeróbicas a CLSI 2012a, e para as bactérias aeróbicas CLSI 2012b.

Para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC), As aeróbicas foram: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Streptococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As anaeróbicas foram: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 48417).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de todas as amostras e antibióticos de referência (cloranfenicol, metronidazol, clorexidina) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (HOLETZ et al., 2002). Foi preparada uma solução estoque de cada amostra numa concentração de 2,0 mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO). Cada inóculo foi assepticamente misturado ao caldo, e sua densidade ajustada para 0,5 da escala de McFarland (10⁸ UFC mL⁻¹) e diluído (1:10) no procedimento de microdiluição, em placa 96 poços. Na microdiluição, foram realizadas diluições seriadas em concentrações de 0,195 à 400,0 µg mL⁻¹ em caldo, a partir da solução estoque de cada amostra, com volume final em cada poço de 200,0 µL. Também foram realizados os controles de esterilidade do caldo, controle do inóculo, controle de esterilidade dos extratos, e controle do solvente (DMSO). Após o preparo das microplacas, estas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C, as bactérias aeróbicas foram incubadas em estufa e as bactérias anaeróbicas na jarra anaeróbica. Decorrido o período, foi determinada a CIM através do uso da resazurina. A determinação da CIM é realizada pelo método colorimétrico, observando-se a mudança da coloração da resazurina em que a presença da cor azul representa ausência de crescimento e a cor rosa é interpretada como presença de crescimento bacteriano (Figura 26).

Figura 25- Ilustração de uma placa de 96 poços utilizada no experimento de microdiluição após adição de resazurina para a determinação da concentração inibitória mínima das bactérias aeróbicas



Fonte: ARAUJO; LONGO (2016).

4.6.3 Determinação atividade antifúngica

Esta atividade foi realizada seguindo o protocolo da NCCLS M27-A3 (2008), pela Universidade de Franca, São Paulo, para os óleos voláteis obtidos das folhas secas e frescas no período de seca e no período de chuva.

Para o ensaio antifúngico foram utilizados os fungos: *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126). Primeiramente, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Após esse período, com o auxílio de alça de platina esterilizada, algumas colônias dos fungos foram transferidas para tubos contendo 2,0 mL de solução salina 0,85%. A densidade dos tubos foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland (6×10^6 UFC mL⁻¹). Em seguida, foram realizadas as diluições recomendadas pela NCCLS M27-A em caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) até que o inóculo obtivesse $1,2 \times 10^3$ UFC mL⁻¹.

A técnica da determinação da CIM foi realizada por microdiluição em placas de 96 poços com o caldo RPMI tamponado a pH 7,2. Foram feitas diluições seriadas das amostras de OV em concentrações de 3000 a 400 µg mL⁻¹, partindo de uma solução estoque previamente preparada de cada amostra em DMSO. O volume final em cada poço era de 200,00 µL.

Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Decorrido este período, foi determinada a CIM através do uso da resazurina. A leitura das placas foi realizada observando-se a mudança da coloração da resazurina, onde a presença da cor azul representa ausência de crescimento, enquanto que a cor rosa é interpretada como presença de crescimento fúngico.

Como controle positivo, foi utilizada a Anfotericina B, sendo diluída para obter a concentração de 16,00 µg mL⁻¹ à 0,80 µg mL⁻¹, na microplaca de 96 poços. Também foram realizados outros controles como: de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), controle do inóculo, controle de esterilidade dos antifúngicos, controle de esterilidade do óleo volátil, e controle do solvente (DMSO) que é o controle negativo.

4.6.4 Determinação da atividade citotóxica

A análise citotóxica foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Tripanossomatídeos, na Universidade Federal de Uberlândia, no campus Umuarama.

Foi realizada utilizando o método de diluição em microplaca. O meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% (v v⁻¹) de soro fetal bovino, L-glutamina (2,00 mM), D-glicose (4.500 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2.000 mg L⁻¹), HEPES (2.380 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1.100 mg L⁻¹), penicilina (60,00 mg L⁻¹), gentamicina (40,00 mg L⁻¹) e estreptomicina (10,00 mg L⁻¹).

As amostras foram dissolvidas em metanol e diluídas com DMEM suplementado, para formar uma solução estoque de 640,0 µg mL⁻¹. A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v v⁻¹).

Para avaliação da citotoxicidade, utilizou-se o método de microdiluição em placa 96 poços. Na realização de cada teste foi preparada uma solução contendo 1×10⁶ células em 10,00 mL de meio DMEM suplementado. Desta solução foram transferidos 100,00 µL para cada poço da microplaca, e esta foi então incubada por 6 horas à 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço. Na sequência, o meio de cultura de cada poço foi retirado e adicionado às soluções das amostras nas concentrações testadas (de 512 µg mL⁻¹ até 4 µg mL⁻¹). O volume final de cada poço foi de 100,00 µL e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 1×10⁴. Foram preparados os controles de crescimento celular, solvente (metanol 3% (v v⁻¹), negativo (0% de viabilidade celular), meio DMEM suplementado e amostras.

4.6.5 Determinação da atividade antiprotozoário

A análise antiprotozoária foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Tripanossomatídeos, Campus Umuarama, na UFU.

O meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% (v v⁻¹) de soro fetal bovino, L-glutamina (2,0 mM), D-glicose (4.500,00 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2.000,00 mg L⁻¹), HEPES (2.380,00 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1.100,00 mg L⁻¹), penicilina (60,00 mg L⁻¹), gentamicina (40,00 mg L⁻¹) e estreptomicina (10,00 mg L⁻¹). O caldo *Brain Heart Infusion*

(BHI) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, e suplementado com 5% de soro fetal bovino e L-glutamina (2,00 mM). As amostras do protozoário *Trypanosoma Cruzi* foram obtidas e mantidas em células Vero à 37°C com atmosfera úmida 5% de CO₂. As amostras de *Leishmania amazonensis* da cepa PH8 foram cultivadas em BHI suplementado à temperatura de 25 °C. Para o teste com *Leishmania amazonensis*, as amostras foram dissolvidas em metanol e diluídos com BHI suplementado, formando uma solução estoque de 640,00 µg mL⁻¹ (composta por 1,00 mg do óleo volátil, 46,50 µL de MeOH e 1.516,00 µL do meio). A concentração final de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v v⁻¹). Para os testes com *Trypanosoma cruzi*, as amostras foram dissolvidas em metanol e diluídos com DMEM, formando uma solução estoque 640 µg mL⁻¹ (composta por 1,0 mg do óleo volátil, 46,00 µL de MeOH e 1516,00 µL do meio). A concentração de metanol da solução estoque não excedeu 3% (v v⁻¹).

A contagem das células foi realizada em uma câmara Neubauer. Para realizar o experimento, as células de protozoários foram recolhidas (2,00 mL de meio) e contadas, através da equação 2:

$$N^{\circ} \text{ células} = \text{somatória de células na câmara de Neubauer} \times 10^4 \times F, \text{ diluição} \times n^{\circ} \text{ mLs}$$

Equação 2

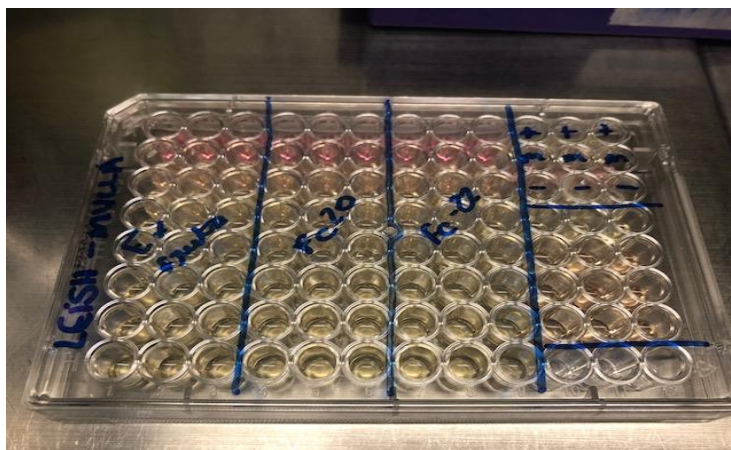
Cada poço das placas de 96 poços, continha 7 x 10⁸ de células de protozoários.

O teste de viabilidade celular foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços (Figura 27), a partir da solução mãe 640,00 µg mL⁻¹, as diluições em série foram feitas com o BHI suplementado (para a *Leishmania amazonensis*), e a diluições em série foram feitas com meio de cultura DMEM (Para a *Trypanosoma cruzi*).

As concentrações testadas foram de 512,00 µg mL⁻¹ a 4,00 µg mL⁻¹. O volume final de cada poço foi de 100,00 µL, sendo 20,00 µL de inóculo (solução com 7×10⁷ parasitas em 2,00 mL) e 80,00 µL das soluções (mãe + meio). Também foram realizados os controles de crescimento do inóculo, solvente (metanol 3%), de inibição (DMSO 30%), meio de cultura e das amostras. As placas de *L. amazonensis* e *T. cruzi* foram incubadas por 48 horas, a 25 °C. Em seguida adicionada 2,00 µL em cada poço de uma solução de resazurina a 3,00 mM em tampão fosfato salina (PBS) (ROLÓN et al., 2006) e novamente incubado nas mesmas condições por 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a partir dos valores das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle de crescimento. A partir desses resultados, foi construído um gráfico de dose-resposta com regressão não linear utilizado no cálculo do IC₅₀ (concentração em que 50% dos parasitas foram inibidos) (CHIBALE et al., 2007).

Figura 26-Placa de 96 poços utilizada para os testes de Leishmania do óleo volátil



Fonte: A autora (2018).

4.6.6 Determinação da inibição das atividades enzimática

As análises de inibição glicosídicas foram realizadas no Instituto de Biotecnologia, na Universidade Federal de Uberlândia, no campus Umuarama. Os óleos voláteis extraídos das folhas *Psidium myrtoides* O. Berg foram analisados em relação à sua capacidade em inibir de inibir as enzimas: α -amilase, α -glicosidase, e lipase.

A metodologia utilizada para determinação da inibição da α -amilase foi o método GALG2CNP modificado, utilizando o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil) β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- α -CNP) e uma fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase (f-AS) (DA SILVA SANTOS et al., 2012; DE GOUVEIA et al., 2014). Para o preparo da f-AS, saliva humana foi coletada pelo método de cuspe e armazenada a -20° C, por 48 h (parecer do comitê de ética da UFU N. 407.597). Após esse período, a saliva foi descongelada e centrifugada a 12000 xg por 10 minutos à 20 °C. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sepharose, utilizando como fase móvel um tampão contendo 50,00 mmol L⁻¹ de Tris-HCl (pH 8,0), 10,00 mmol L⁻¹ de EDTA e 10,00 mmol L⁻¹ de EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50,00 mmol L⁻¹; pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50,00 mmol L⁻¹ de tampão ácido 2-(Nmorfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5,00 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio,

140,00 mmol L⁻¹ de tiocianato de potássio e 300,00 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (pH 6,0). As amostras do óleo volátil foram dissolvidas em DMSO e incubadas com a f-AS (proporção de 1:10), durante 30 minutos à 37° C. A reação foi iniciada pela adição de 320,00 µL do substrato GAL-G2-α-CNP (12 mmol L⁻¹), e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm durante 3 minutos, com intervalo de 1 minuto à 37° C. O controle foi realizado substituindo o óleo volátil por tampão MES. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi apresentado como porcentagem de inibição da α-amilase, calculado por meio da Equação 5. As Equações 3 e 4, determinam a atividade da enzima em UmL⁻¹ e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (Equação 5).

$$\text{Atividade da } \alpha \text{ - amilase } \left(\frac{U}{mL} \right) = \left[\left(\frac{\Delta Abs \cdot V_f \cdot F_d}{\epsilon \cdot V_s \cdot l} \right) \right] \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Atividades } \alpha \text{ - amilase } (\%) = \frac{(\text{Amostra})}{(\text{Controle})} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Inibição da } \alpha \text{ amilase } (\%) = 100 - (\text{Atividade da } \alpha \text{ - amilase em } \%) \quad \text{Equação 5}$$

Onde: $\Delta Abs/min = [(Abs_3 - Abs_1)/2]$ é a diferença de absorbância por minuto (Abs = absorbância; 1 e 3 = minutos); V_f é o volume total da reação (328 µL); V_s é o volume de amostra (óleo volátil + enzima α-amilase, 8 µL); F_d é o fator de diluição da saliva (50); ϵ é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-p-nitrofenol; l é o comprimento do percurso da luz (0,97); o controle é a atividade da α-amilase e, a amostra é a atividade da α-amilase na presença do óleo volátil. Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC₅₀.

A metodologia utilizada para determinação da inibição α-glicosidase é descrita por SHAN et al., (2016) e TOMA et al., (2014). Para verificação da capacidade de inibir a atividade da enzima α-glicosidase foi utilizado o substrato 4-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo (p-NPG) e uma fração enriquecida da enzima α-glicosidase (f-AG). Foram usados 200 mg de pó de intestino de rato, para preparo da f-AG. A massa foi solubilizada em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m/v).

A solução homogeneizada foi centrifugada a 12000 xg durante 30 minutos e o sobrenadante (f-AG) foi usado no ensaio. As amostras de óleos voláteis foram solubilizadas em DMSO, na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ e incubadas com a f-AG e 1,5 mmol L⁻¹ de glutatona reduzida (diluída em tampão fosfato a 50,0 mmol L⁻¹, pH 6,8), durante 20 minutos, na temperatura de 37°C. A reação teve início com a adição do substrato p-NPG (4 mmol L⁻¹,

em tampão fosfato de sódio a 50,0 mmol L⁻¹, pH 6,8). Os valores de absorvância foram medidos a 405 nm, a cada 5 minutos, no período de 30 minutos, na temperatura de 37 °C. Para o controle negativo, a amostra foi substituída por tampão fosfato e para controle positivo, foi utilizada a acarbose, ambos na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Os testes foram feitos em triplicata e o resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase, calculado por meio da Equação 6.

$$\text{Inibição da } \alpha \text{ - glicosidase \%} = [\text{ASC cont.} - \text{ASC amost.} / \text{ASC controle}] \times 100$$

Equação 6

Onde: ASC cont. é a área sob a curva na ausência da amostra e ASC amost. é a área sob a curva na presença da amostra.

A metodologia utilizada para determinação da inibição da lipase foi de Gupta e colaboradores (GUPTA; RATHI; GUPTA, 2002). Para o teste foi utilizado como substrato o palmitato de p-nitrofenil (p-NPP) e lipase pancreática suína (PL) (tipo II, Sigma). As amostras foram previamente dissolvidas em DMSO até atingirem a concentração de 2,00 mg mL⁻¹ e em seguida, incubadas durante 20 minutos, na temperatura de 37 °C, com uma concentração de PL 10,00 g L⁻¹ (diluída em 0,05 mol L⁻¹ de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,01 mol L⁻¹ de CaCl₂ e 0,025 mol L⁻¹ de NaCl). A reação teve início com a adição de 0,008 mol L⁻¹ p-NPP (diluído em 0,50% Triton X-100). Os valores de absorvância foram medidos em 410 nm, durante 30 minutos e na temperatura de 37 °C. Para controle positivo foi utilizado Orlistat e como controle negativo foi empregado DMSO, ambos na concentração de 2,00 mg mL⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são demonstrados em porcentagem de inibição de lipase, calculada de acordo com a Equação 7.

$$\text{Inibição da lipase (\%)} = [\text{ASC cont.} - \text{ASC amost.} / \text{ASC controle}] \times 100$$

Equação 7

Onde: ASC cont. é a área sob a curva na ausência da amostra e ASC amost. é a área sob a curva na presença da amostra.

4.6.7 Docking molecular com as enzimas

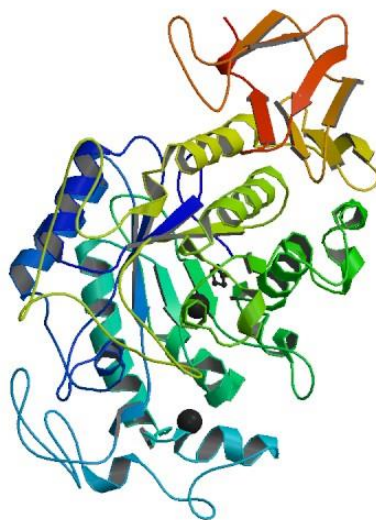
4.6.7.1 Programas (softwares) utilizados

Para a realização dos desenhos moleculares 3D dos ligantes foi utilizado o software *UCSF Chimera*. O ancoramento foi realizado pelo *ArgusLab* 4.0.1 (THOMPSON MA., 2004). Todos os desenhos 3D das macromoléculas construídas utilizando o sistema *DISCOVERY STUDIO VISUALIZER SOFTWARE* (2012).

No *Protein Data Bank* (PDB) é feita a seleção da enzima do estudo, e, através do banco de dados, há busca por uma série de enzimas de α -amilases. Na figura 28 está a enzima α -amilase de código 1JXJ no PDB, que foi selecionada para o presente estudo.

Na figura 29 é mostrada a enzima selecionada da lipase pancreática no PDB de código 1LPB.

Figura 27- Representação 3D do complexo alfa-amilase (1JXJ) com acarbose obtida no Protein Bank



Legenda: O íon cálcio e o íon cloreto (esferas pretas) são mostrados na vizinhança do centro catalítico da enzima.

Fonte: Protein Data Bank (2019).

Figura 28- Representação 3D do complexo de colipase pancreática lipase (1LBP) com um ligante alquil fosfonato obtida no Protein Bank



Legenda: O íon cálcio (esfera preta) e ligante ácido metoximecosfosfínico (ligante representado por bola e bastão em preto e vermelho) são mostrados na vizinhança do centro catalítico da enzima.

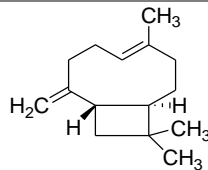
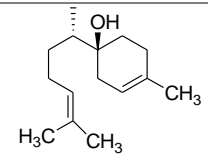
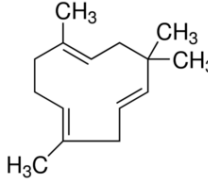
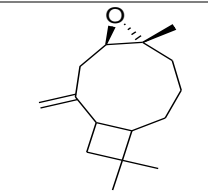
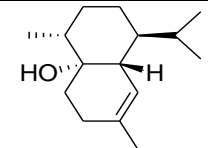
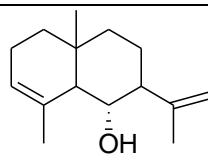
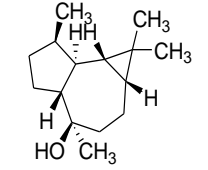
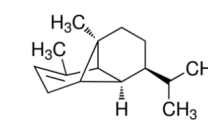
Fonte: Protein Data Bank (2019).

A escolha foi pela lipase pancreática (1LBP) demonstrada na figura 29. As lipases enzimas responsáveis pela hidrólise e conversão de triacilgliceróis à ácidos graxos livres e glicerol.

No programa *UCSF Chimera* foi colocado o código SMILE¹ (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) para cada ligante obtido pelo site PUBCHEM. A estrutura bidimensional de cada ligante foi gerada em 3D pelo programa *Chimera* e, salvo no formato.pdb, para posteriormente, ser aberto como arquivo no *Arguslab* e ser realizado o ancoramento ligante-enzima. A estrutura 2D e o código smiles dos ligantes estão exibidos na tabela 5 (Com exceção do ligante cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol que foi desenhado no software *Chemdraw* e gerado em 3D no *Discovery Visualizer*).

¹ O código *SMILES* é um sistema linear de notação química, desenvolvido especialmente para o uso computacional, onde as estruturas moleculares são especificadas de forma precisa.

Tabela 5-Estrutura bidimensional (2D) dos ligantes que são gerados em 3D pelo software UCSF Chimera a partir do código SMILES

Código SMILES	Estrutura 2D	Nome
<chem>C/C1=C\CCC(=C)[C@H]2CC([C@@H]2C1)(C)C</chem>		β -cariofileno
<chem>CC1=CC[C@@H](CC1)[C@@](C)(CCC=C(C)C)O</chem>		α -bisabolol
<chem>C/C1=C\CC(/C=C/C/C(=C/CC1)/C)(C)C</chem>		α -humuleno
<chem>C[C@@]12CC[C@H]3[C@H](CC3(C)C)C(=C)CC[C@H]1O2</chem>		Óxido de cariofileno
<chem>C[C@@H]1CC[C@H]([C@H]2[C@]1(CCC(=C2)C)O)C(C)C</chem>		Cubenol
<chem>C=C(C)C1CCC2(C)CCC=C(C)C2C1O</chem>		Selina-3,11-dien-6- α -ol
<chem>C[C@@H]1CC[C@@H]2[C@@H]1[C@H]3[C@H](C3(C)C)CC[C@@]2(C)O</chem>		Globulol
<chem>CC(C)[C@@H]1CC[C@]2([C@H]3C1C2CCC3=C)C</chem>		α -copaeno

Fonte: A autora (2019).

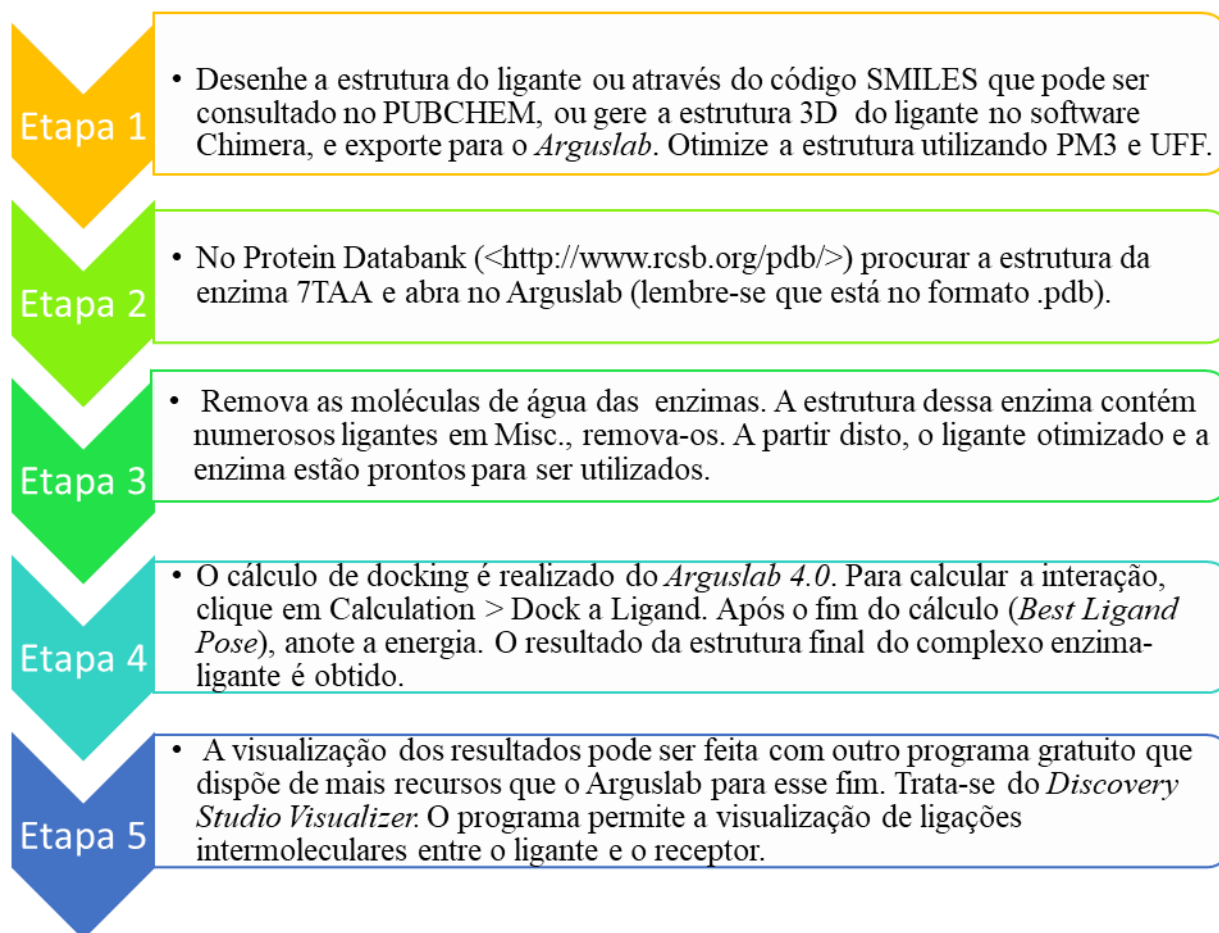
Os cálculos de energia de ligação obtidos através do *docking* molecular foi realizado através do pacote computacional *ArgusLab* 4.0.1. A figura 30 mostra uma janela com a penúltima etapa, o ancoramento molecular, promovido entre o ligante e a enzima. A última etapa é manipulada através de outro software *Discovery Studio Visualizer 2.0*, através deste programa é possível obter outras informações com respeito ao complexo obtido. As seqüências das etapas do processo de *docking* realizada neste trabalho pode ser melhor compreendida pelo esquema da figura 31.

Figura 29-Representação da janela de cálculo de “Docking ” para o receptor-ligante utilizando ArgusLab4.0



Fonte: A autora (2019).

Figura 30-Diagrama das etapas seguidas do docking molecular



Fonte: A autora (2019).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos das amostras de óleo volátil

Para a determinação do rendimento do óleo volátil das folhas frescas e secas à sombra no período de setembro de 2017 (Período de seca), e aquele das folhas frescas e secas à sombra no período de fevereiro de 2018 (Período de chuva), foi utilizada a equação 1 descrita na metodologia.

Figura 31-Fotografia do óleo volátil obtido das folhas de *Psidium myrtooides*



Fonte: A autora (2018).

Tabela 6-Rendimento do óleo volátil da *P. myrtooides* nos períodos de seca e chuva

Amostra	Umidade folhas (%)	Rendimento (%) \pm dp
OVFF ¹	50	1,08 \pm 0,04
OVFS ¹	16	0,77 \pm 0,01
OVFF ²	55	1,4 \pm 0,08
OVFS ²	15	1,14 \pm 0,02

Legenda: OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca; ² Período de chuva. dp = desvio padrão para o experimento em triplicata.

Os óleos voláteis extraídos das folhas frescas da *Psidium myrtooides* O. Berg apresentaram os maiores rendimentos (1,08%;1,4%) em dois períodos do ano. Os óleos extraídos da folha seca apresentaram os menores rendimentos (0,77%;1,14%) nos dois períodos do ano. Segundo relatos na literatura (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), a diferença de rendimento pode ser atribuída às condições climáticas, em que o mês de fevereiro no Brasil (verão) há maior precipitação de chuva, apresentando maior temperatura média e maior umidade relativa do ar, ocasionando condições favoráveis para produção de óleo volátil. Esse

fato está de acordo com os resultados da tabela 6, pois o maior rendimento foi para o óleo volátil obtido no período de chuva.

FURTADO et al., (2014), estudando a variação sazonal do óleo volátil de *Inga Laurina* (Sw.) Willd, concluíram que o rendimento do óleo volátil foi maior no período da seca (0,00371%) do que do período de chuva (0,00307%). A influência da sazonalidade na composição química dos óleos voláteis também foi demonstrada por BOTREL et al., (2010) com a espécie *Hyptis marrubioides*, e o maior rendimento em teor de óleo obtido a partir da massa seca foi obtido no período de maior precipitação de chuva (0,42%) e o menor rendimento no período de menor precipitação de chuva (0,27%). Já os teores de óleo volátil das folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii* (LOURA, 2015) foram maiores no período de inverno (0,33%), e o menor rendimento no período de verão (0,18%).

O teor de óleo volátil produzido não depende apenas da espécie em questão, mas também do horário de coleta do material vegetal e da época do ano que este material vegetal é coletado, pois a natureza dos constituintes não é constante durante todo ano, podendo influenciar no metabolismo secundário das plantas, devido os fenômenos extrínsecos que ocorrem (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SILVA et al., 2016).

5.2 Composição química do óleo volátil de *Psidium myrtiloides* O. Berg

O estudo sazonal com a espécie de *P. myrtiloides* avaliou a variação da composição química no período de seca (tabela 7-8) e chuva (tabela 9-10) e, também avaliou a composição química pelo método de secagem das folhas à sombra por 72h nas duas estações do ano.

Figura 32-Cromatogramas de CG-EM dos óleos voláteis de *P. myrtiloides* da época de seca

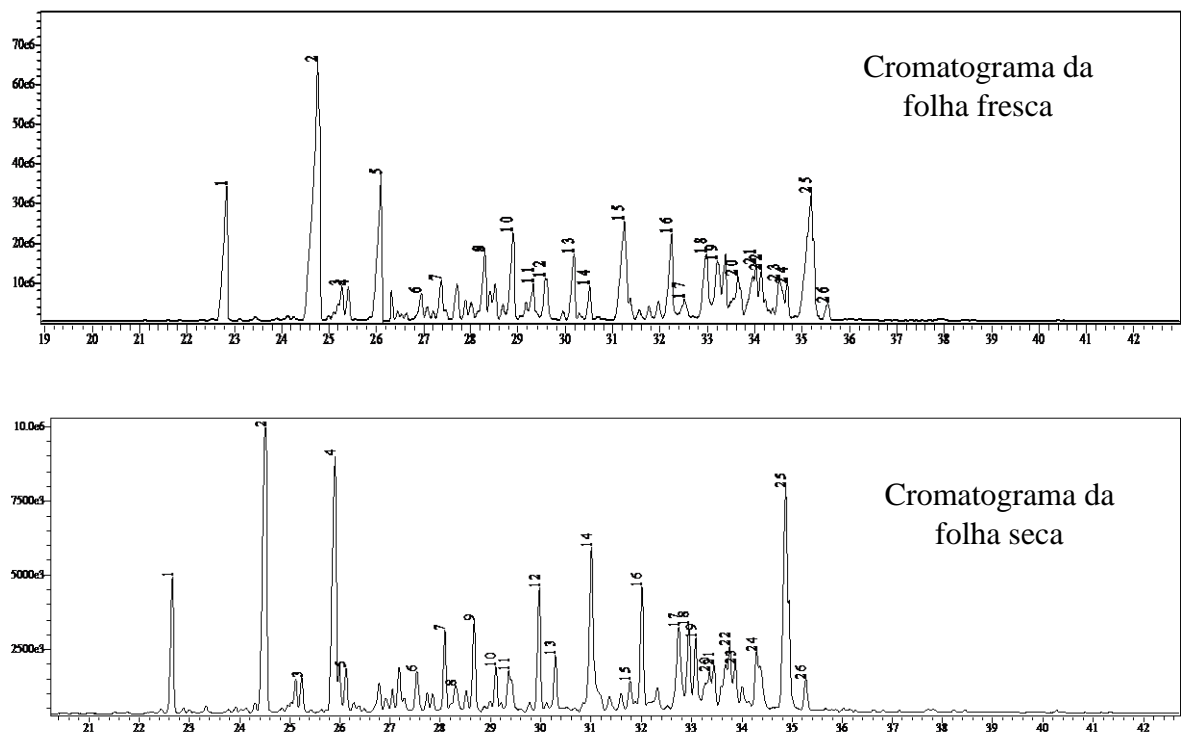
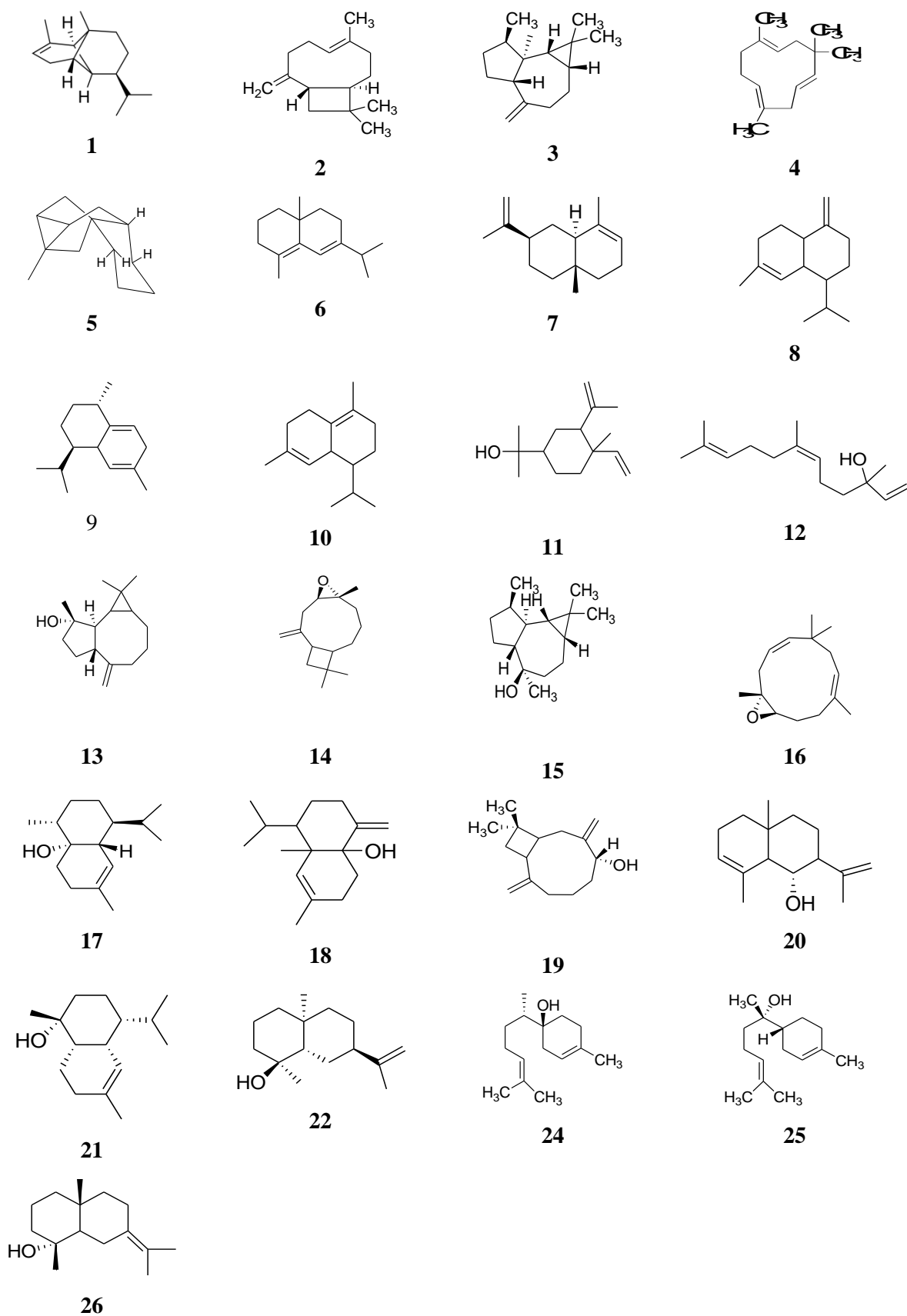


Tabela 7- Composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas na época de seca

	Composto	AI exp. Folha fresca	AI exp. Folha seca	AI literatura	Área relativa* (%) Folha fresca	Área relativa* (%) Folha seca
1	α-copaeno	1383	1379	1377	8,92	6,97
2	trans- cariofileno	1430	1423	1417	23,23	21,62
3	aromadandreno	1443	1442	1439	1,40	1,34
4	α-humuleno	1446	1458	1452	15,56	17,40
5	ishwarane	1464	1464	1465	0,78	0,93
6	δ -selineno	1495	1499	1492	1,04	1,79
7	α -selineno	1495	1497	1498	1,06	2,70
8	δ -cadineno	1499	1519	1513	2,82	0,76
9	trans-cadina-1,4- dieno	1519	1528	1533	0,92	2,14
10	cadineno	1534	1539	1537	4,76	1,66
11	elemol	1544	1545	1548	1,49	1,75
12	trans-nerolidol	1551	1561	1561	1,99	2,28
13	(-)-espatulenol	1566	1569	1577	2,51	1,20
14	óxido de cariofileno	1574	1587	1582	7,69	13,59
15	globulol	1593	1607	1608	0,65	0,35
16	époxi de humuleno II	160	1613	1608	2,61	6,09
17	cubenol	1627	1634	1645	3,62	3,79
18	muurola- 4,10(14)dien-1- β -ol	1640	1639	1630	0,33	0,22
19	cariofila- 4(12),8(13)-dien- 5- α -ol	1646	1643	1639	0,12	0,24
20	selina-3,11-dien- 6- α -ol	1658	1651	1642	0,03	0,29
21	muurolol < α >	1669	1653	1644	1,79	1,50
22	intermedeol < neo >	1672	1662	1658	1,33	1,17
23	N.I					
24	β -bisabolol	1687	1677	1674	0,89	2,23
25	α-bisabolol	1701	1693	1685	10,16	5,89
26	eudesm-7-(11)- em-4-ol	1712	1704	1700	0,79	0,73
Total					96,49	98,63
N.I					0,51	1,30

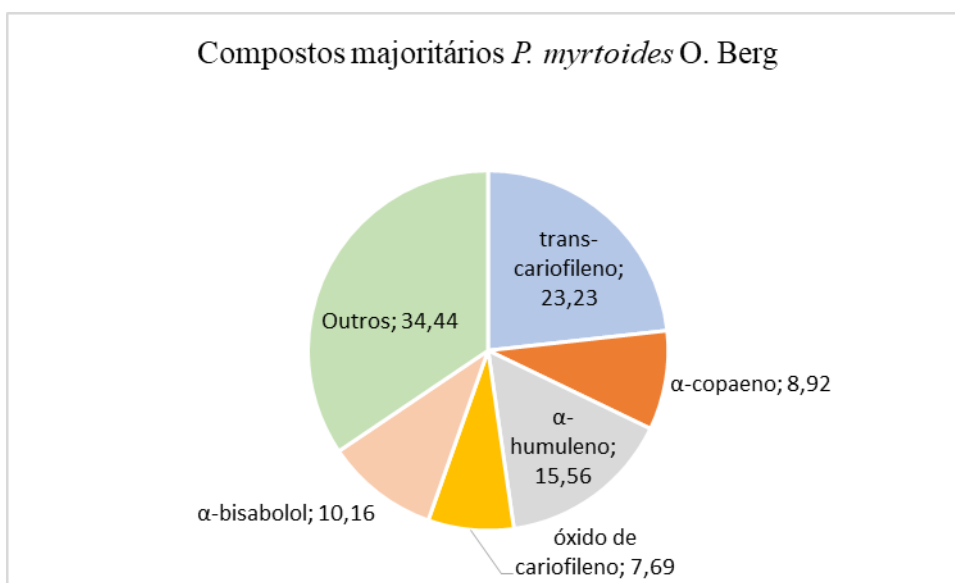
Legenda: AI_{exp} Índice de retenção determinado em relação ao padrão n -alcanos C_8 - C_{30} em coluna OV-5 (30m X 0,25; 0,25 μ m); AI_{lit} : Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); *Área relativa (%): Pico da área relativa sobre a área total no CG-FID, por três replicatas. N.I = Não-identificado.

Tabela 8- Compostos químicos dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas no período de seca identificados por CG-EM

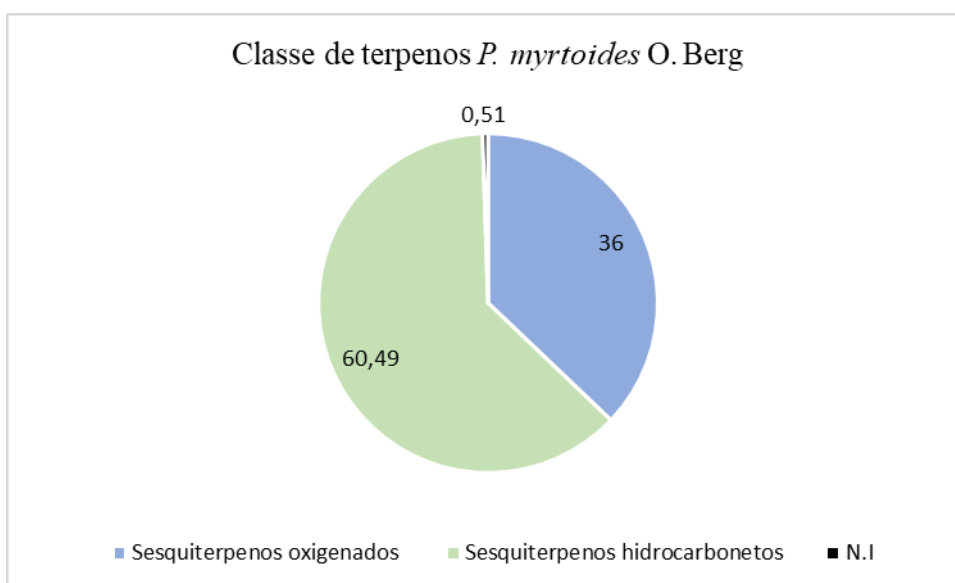


Os constituintes majoritários do OV das folhas frescas, estão no gráfico da figura 33, apresentando o α -copaeno (8,92%), trans-cariofileno (23,23%), α -humuleno (15,56%), óxido de cariofileno (7,69%), e α -bisabolol (10,16%) como os constituintes mais abundantes no OV da planta. A classe de terpenos com maior frequência são os sesquiterpenos hidrocarbonetos com 60,49%, e em seguida, os sesquiterpenos oxigenados com 36%, e os não-identificados (N.I) representam 0,51%, conforme mostrado na figura 33.

Figura 33-Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas frescas na *da P. myrtoides* na época de seca



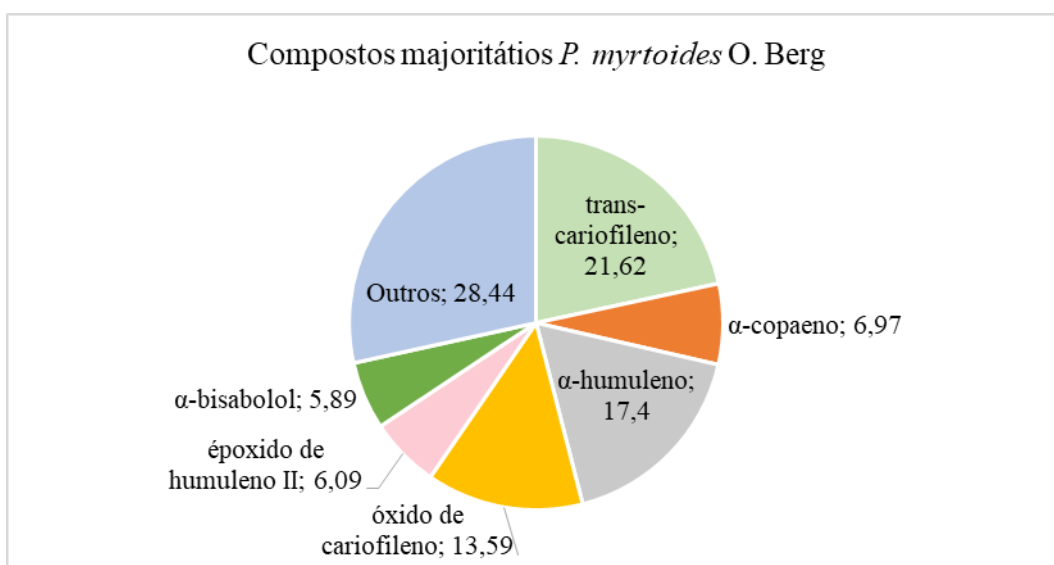
(a)



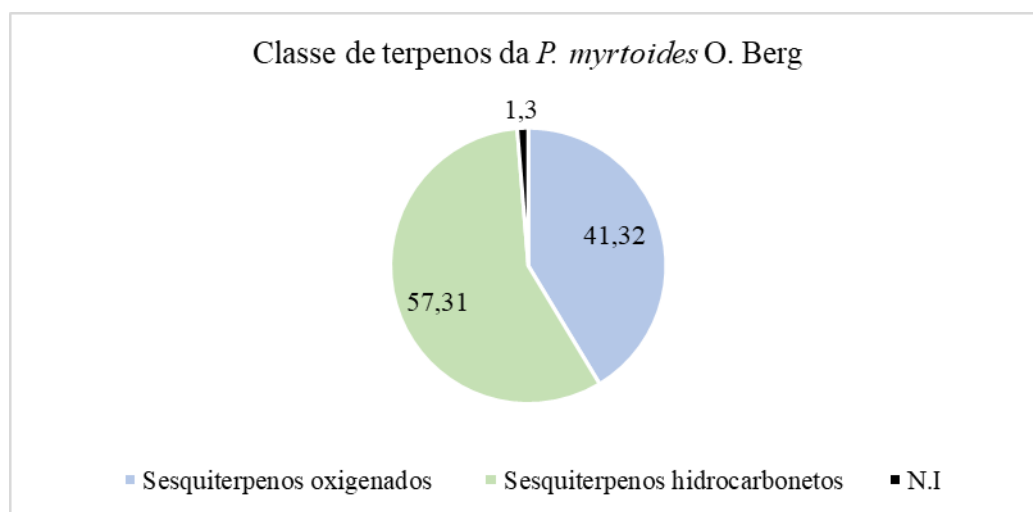
(b)

Os constituintes majoritários do OV das folhas secas também estão demonstrados no gráfico da figura 34, apresentando o α -copaeno (6,97%), trans-carofileno (21,62%), α -humuleno (17,40%), óxido de cariofileno (13,59%), epóxido de humuleno II (6,09 %), e α -bisabolol (10,16%) como os mais abundantes do OV da planta. A classe de terpenos com maior frequência são os sesquiterpenos hidrocarbonetos que representam 57,31 %, e os sesquiterpenos oxigenados aparecem com 41,32%, e os N.I representam 1,3%, conforme mostrado no gráfico da figura 34.

Figura 34-Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas secas na da *P. myrtoides* na época de seca



(a)



(b)

Para os óleos voláteis obtidos das folhas coletadas no período chuvoso, conforme os gráficos da figura 35 e a tabela 9, houve uma variação qualitativa e quantitativa nos constituintes químicos, porém, os compostos majoritários, mantiveram-se inalterados. Não houve alteração desses constituintes químicos quando foi realizado a secagem à sombra por 72 h. Neste período chuvoso foram identificados 22 compostos químicos conforme identificados na tabela 9 e 10.

Figura 35-Cromatogramas de CG-EM dos óleos voláteis de *P. myrtiloides* na época de chuva

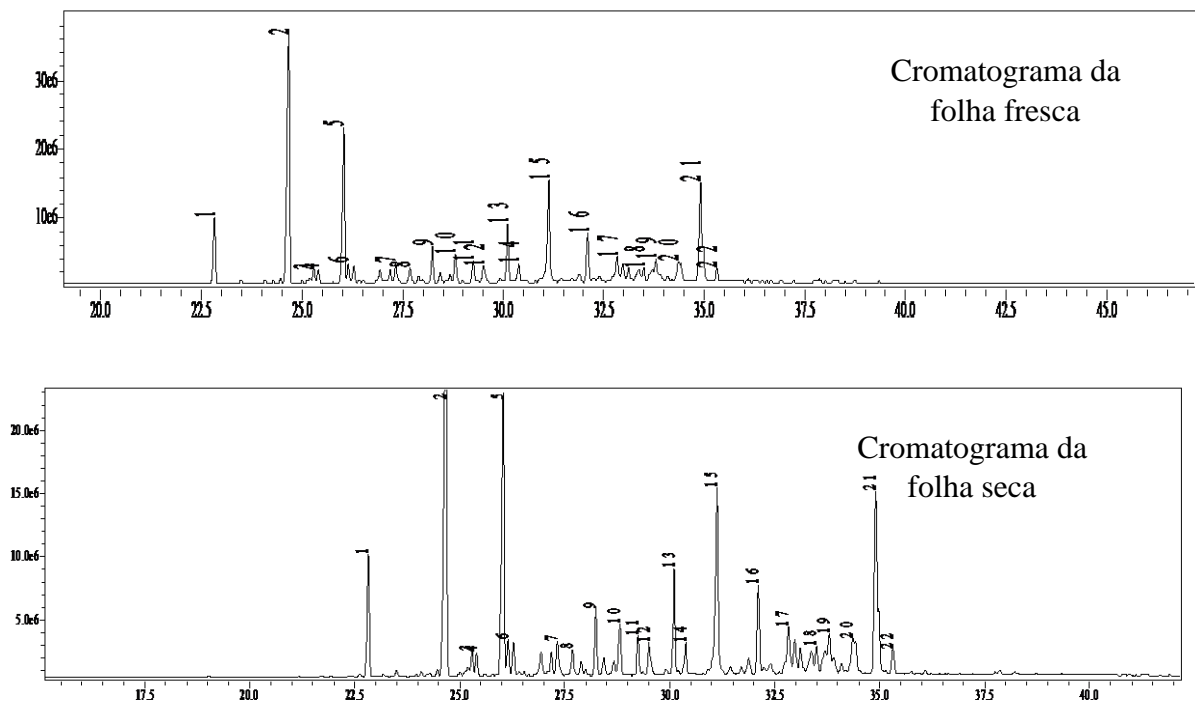
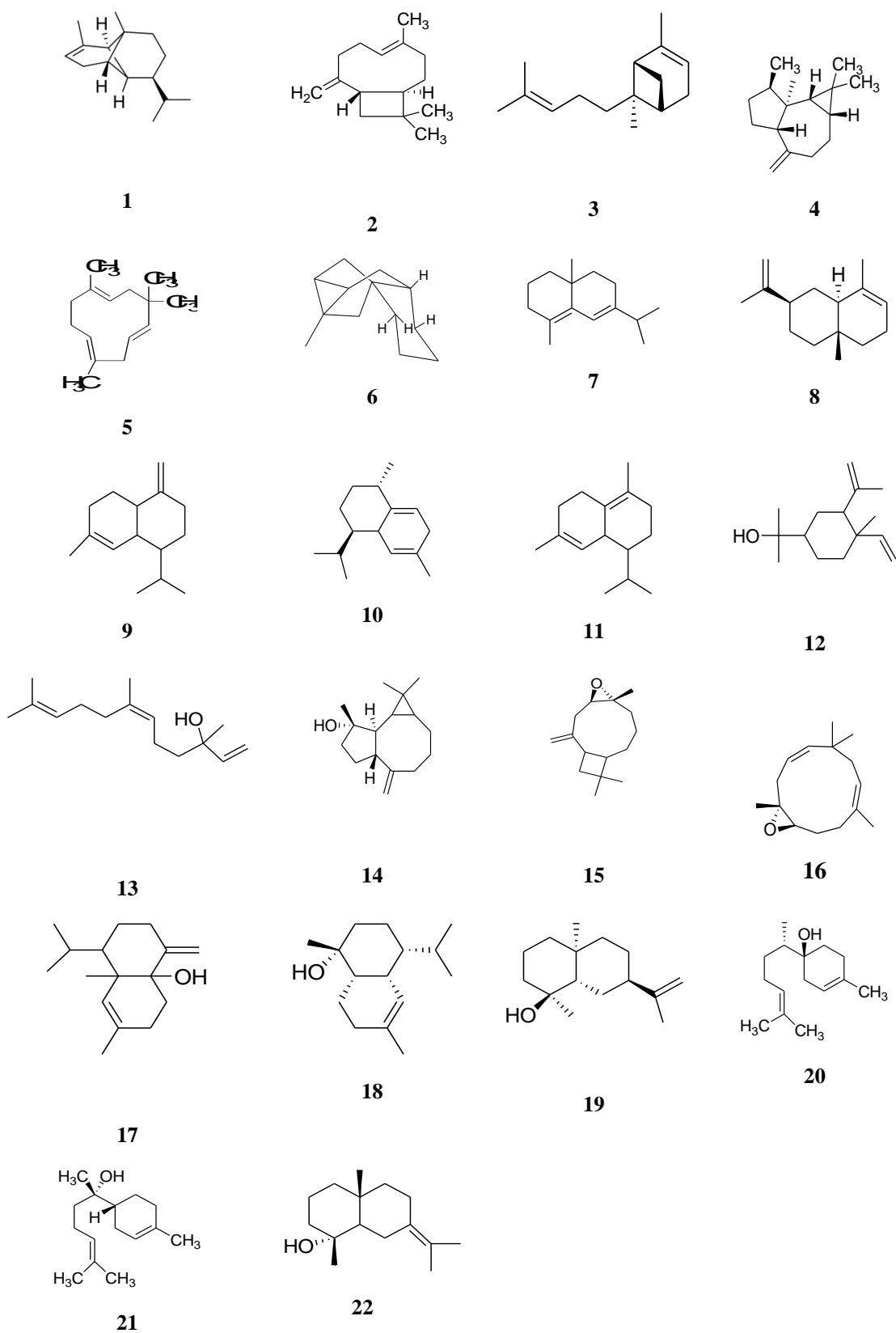


Tabela 9- Composição química dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas no período de chuva

	Composto	AI exp. Folha fresca	AI exp. Folha seca	AI literatura	Área relativa* (%) Folha fresca	Área relativa* (%) Folha seca
1	α -copaeno	1334	1382	1377	4,86	7,11
2	trans- cariofileno	1375	1427	1417	18,02	27,38
3	trans- α - bergamoteno	1392	1443	1438	1,31	1,89
4	Aromadandreno	1408	1446	1439	1,02	0,39
5	α-humuleno	1414	1462	1452	13,56	16,18
6	Ishwarane	1431	1465	1465	0,28	0,51
7	δ -selineno	1440	1495	1492	1,29	1,97
8	α -selineno	1449	1500	1498	1,66	2,81
9	δ -cadineno	1464	1515	1513	2,64	0,7
10	trans-cadina- 1,4-dieno	1465	1529	1533	1,3	1,88
11	α -cadineno	1477	1540	1537	1,13	1,97
12	elemol	1487	1547	1548	1,36	1,39
13	trans-nerolidol	1494	1563	1561	0,91	1,65
14	(-)-espatulenol	1508	1570	1577	1,35	0,91
15	óxido de cariofileno	1518	1590	1582	20,66	11,41
16	époxi de humuleno II	1533	1617	1608	10,21	4,29
17	muurola- 4,10(14)dien-1- β -ol	1557	1636	1630	1,17	1,39
18	muurolol < α >	1577	1655	1644	1,18	0,98
19	Intermedeol <neo>	1590	1663	1658	4,56	4,16
20	β -bisabolol	1601	1679	1674	2,65	2,18
21	α-bisabolol	1618	1694	1685	7,5	8,1
22	eudesm-7-(11)- em-4-ol	1633	1382	1439	0,79	0,75
	Total				99,41	100
	N.I				0	0

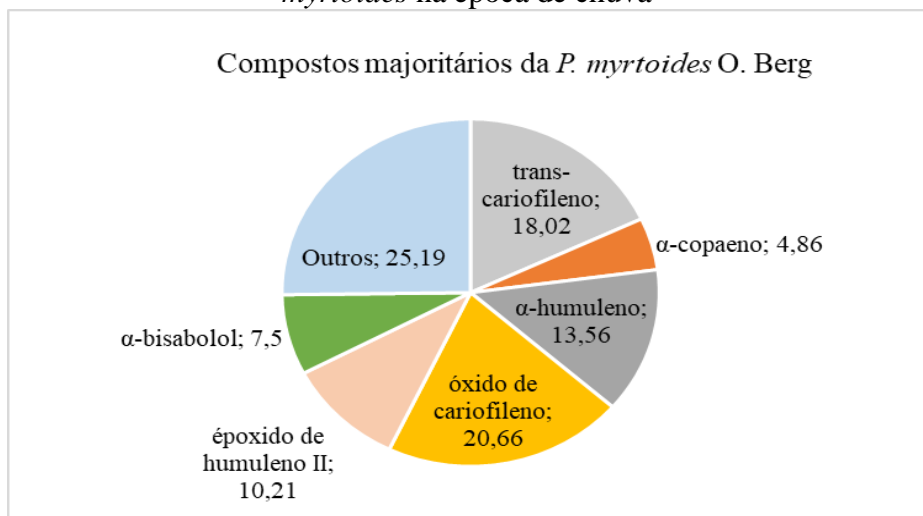
AI_{exo} Índice de retenção determinado em relação ao padrão *n*-alcanos (C₈-C₃₀) em coluna OV-5 (30m X 0.25; 0.25 μ m); AI_{lit} : Índice de retenção da literatura (Adams, 2007); ***Área relativa (%)**: Pico da área relativa sobre a área total no CG-FID, por três replicatas. **N.I** = Não-identificado.

Tabela 10- Compostos químicos dos óleos voláteis obtidos das folhas frescas e folhas secas na época de chuva identificados por CG-EM

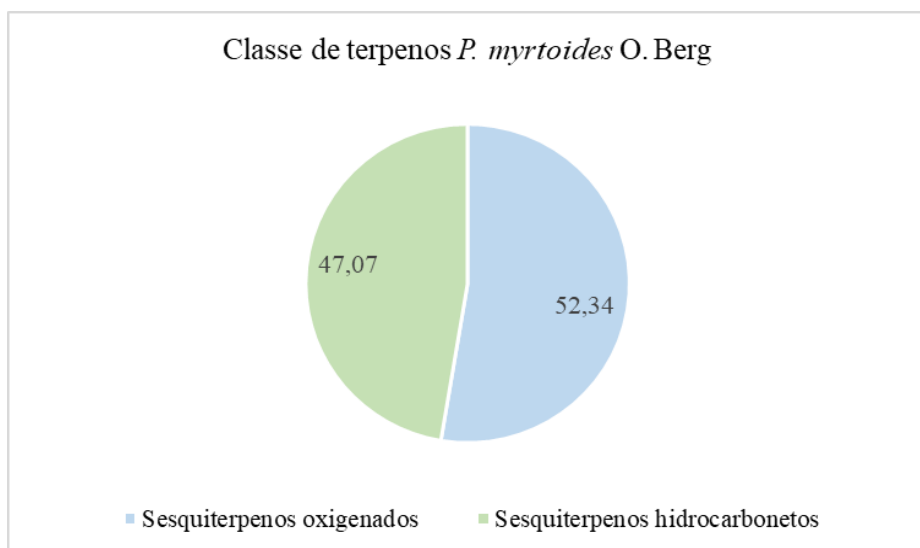


Os constituintes majoritários do óleo volátil da folha fresca no período de chuva, estão no gráfico da figura 36, apresentando o α -copaeno (4,86%), trans-carofileno (18,02%), α -humuleno (13,56%), óxido de cariofileno (20,66%), epóxido de humuleno II (10,21%), e α -bisabolol (7,5%) como os mais abundantes do OV da planta. A classe de terpenos com maior frequência são os sesquiterpenos hidrocarbonetos que representam 47,07% e, os sesquiterpenos oxigenados representam 52,34%, conforme mostrado na figura 36.

Figura 36- Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas frescas na da *P. myrtoides* na época de chuva



(a)

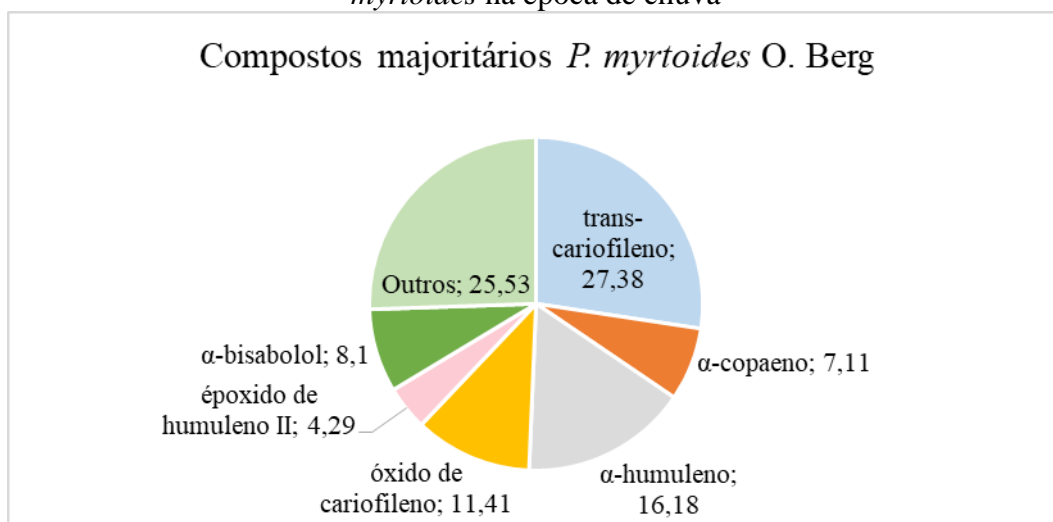


(b)

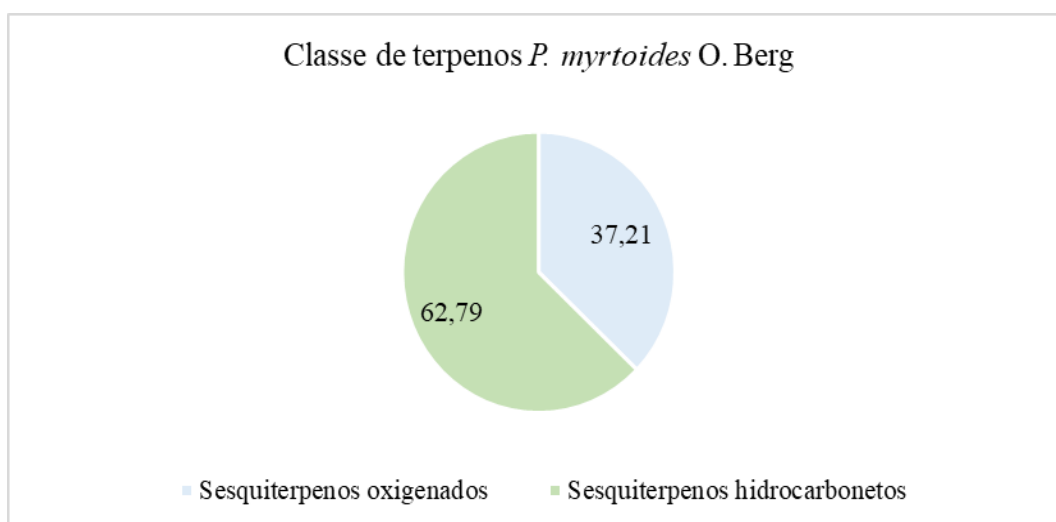
Fonte: A autora (2019).

Os constituintes majoritários do óleo volátil da folha seca estão demonstrados no gráfico da figura 37, apresentando o α -copaeno (4,86%), trans-carofileno (18,02%), α -humuleno (13,56%), óxido de cariofileno (20,66%), epóxido de humuleno II (10,21%), e α -bisabolol (7,5%) como os constituintes mais abundantes no OV da planta. A classe de terpenos presente são: Os sesquiterpenos hidrocarbonetos que representam 62,79%, e os sesquiterpenos oxigenados representam 37,21%, conforme mostrado no gráfico da figura 37.

Figura 37-Constituintes majoritários (a) e a classe de terpenos (b) das folhas secas na da *P. myrtoides* na época de chuva



(a)



(b)

Fonte: A autora (2019).

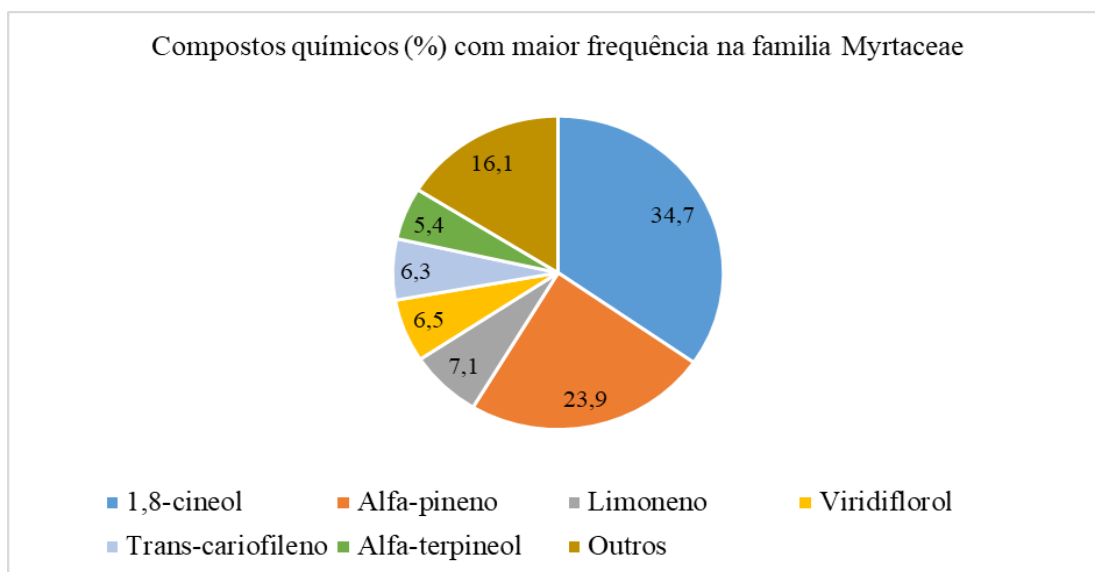
Nos óleos voláteis das folhas de *Psidium guajava* e de outras espécies da família Myrtaceae, o trans-cariofileno, o α -humuleno, o β -bisabolol e o óxido de cariofileno são muito encontrados e sofrem variação da sua composição química dependendo do cultivar² (MENDES et al., 2017). Assim como fatores extrínsecos já mencionados influenciam no teor do óleo volátil, também influenciam na variabilidade da composição do óleo volátil, por exemplo: temperatura, a umidade relativa, duração total de exposição ao sol, e o regime de ventos exercem influência direta, principalmente, sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Além do mais o grau de hidratação do terreno e a presença de micronutrientes (N, P, K) também podem influenciar na composição dos óleos voláteis, contudo não se pode prever um padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada. (SIMÕES et al., 2017).

O acesso ao banco de dados de óleo volátil chamado *EssOilDB* permite que seja feita uma comparação dos resultados de composição química obtidos no presente trabalho com o gênero *Psidium* e com a família Myrtaceae utilizando o banco de dados.

Na figura 38 é mostrado 1,8 cineol ou eucaliptol (Figura 40) como é chamado, corresponde a 34.7% como composto químico que aparece com maior frequência obtido a partir das folhas de *Myrtaceae*. O segundo composto mais abundante é o alfa-pineno (23.9%). O 5º composto mais abundante é o trans-carofileno (6.3%) obtido a partir das folhas, ramo e flores. Vários estudos foram realizados para comparar perfis de óleo essencial sob diferentes condições experimentais através do banco de dados *EssOilDB* (KUMARI et al., 2014). Com uma busca de 17.982 registros obtemos a variação de compostos químicos dentro da família *Myrtaceae*, conforme a figura 39. Os monoterpenos correspondem a 25,70% dos compostos obtidos, seguidos de derivados de monoterpenos (23,30%), e sesquiterpenos (10,60%).

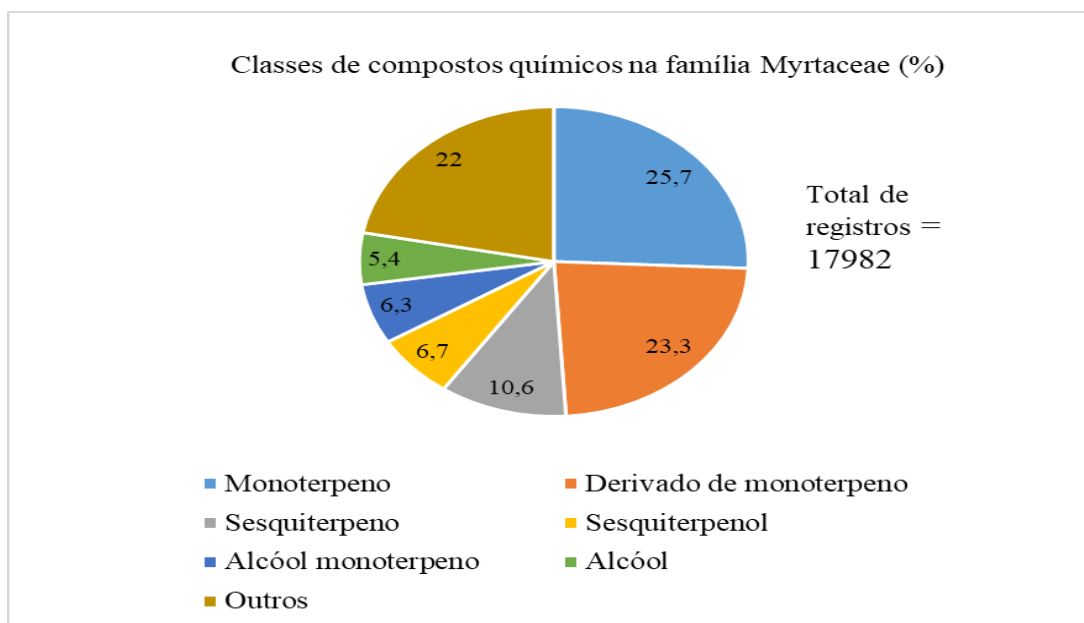
² Segundo a Lei de Proteção de Cultivares, [Lei n.º 9.456/1997](#), cultivares são espécies de plantas que foram melhoradas devido à alteração ou introdução, pelo homem, de uma característica que antes não possuíam. Elas se distinguem das outras variedades da mesma espécie de planta por sua homogeneidade, estabilidade e novidade.

Figura 38- Representação dos registros da família Myrtaceae no EssoilDB: Compostos químicos mais frequentes e suas estruturas químicas



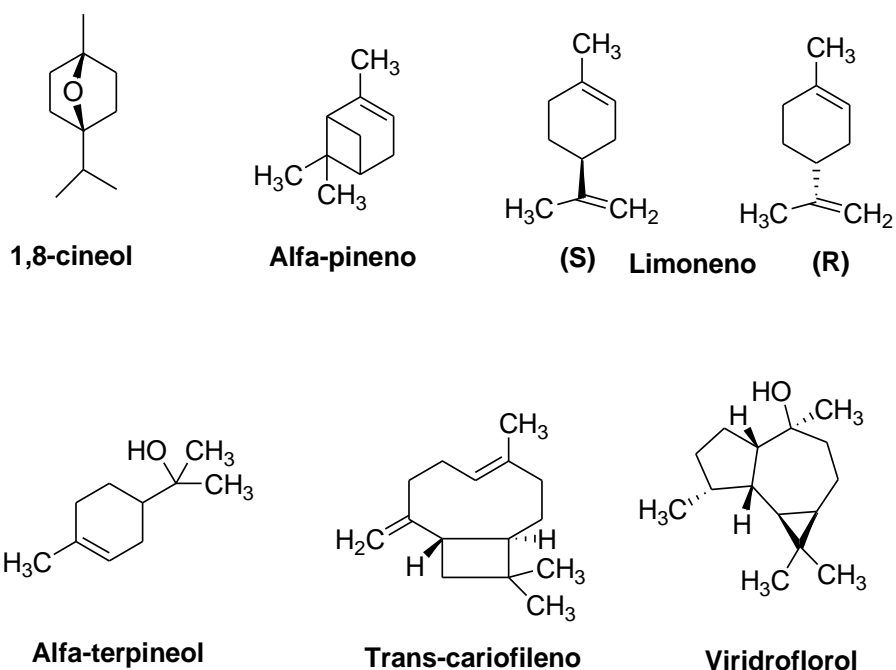
Fonte: Adaptado de ESSOILDB (2018).

Figura 39- Classe de Compostos químicos descritos da família Myrtaceae



Fonte: Adaptado de ESSOILDB (2018).

Figura 40-Compostos químicos mais frequentes na família Myrtaceae e suas estruturas químicas

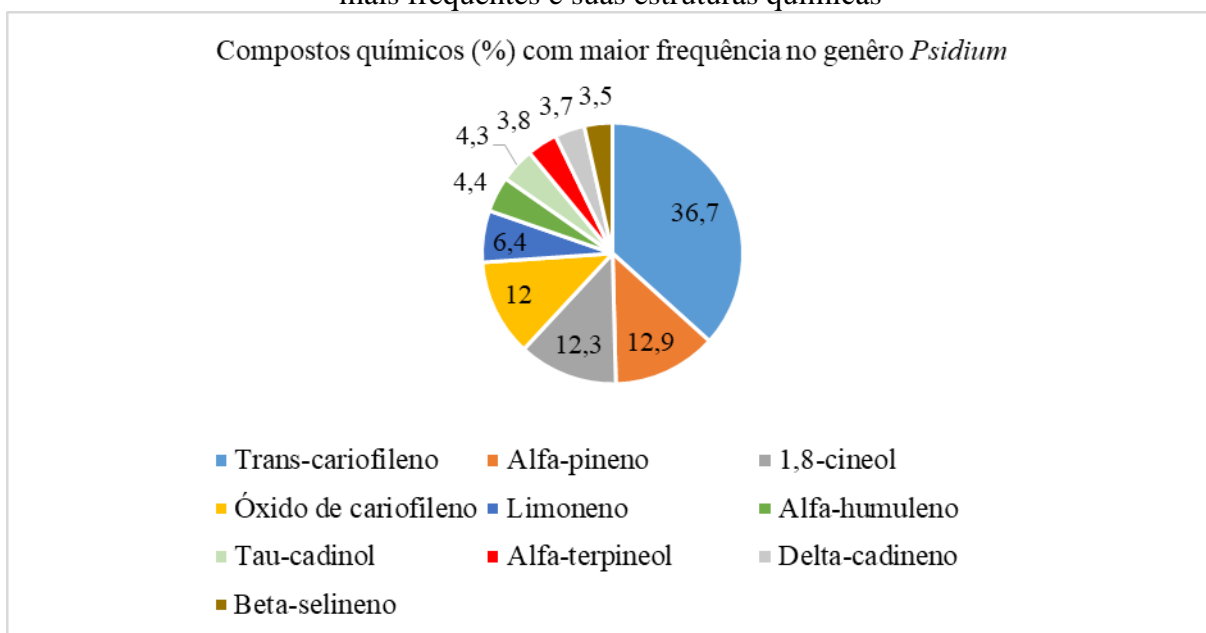


Fonte: A autora (2019).

Através de uma busca no banco de dados da *EssOilDB* também é possível fazer o levantamento dentro do gênero *Psidium* sobre as espécies que apresentam uma determinada frequência de terpenos. As espécies mais frequentes do gênero são: *Psidium guajava*, *Psidium cattleianum*, *Psidium guineense* e *Psidium wrightii* (EssOilDB, 2018). Conforme está representado nos quatro gráficos da figura 41, o trans-cariofileno (36,7%) é o sesquiterpeno cuja classe terpênica possui maior frequência dentro do gênero *Psidium*. Em seguida, representado na figura 41, vem o alfa-pineno (12,9%), 1,8-cineol (12,3%), e o óxido de cariofileno com (12%) (Figura 43).

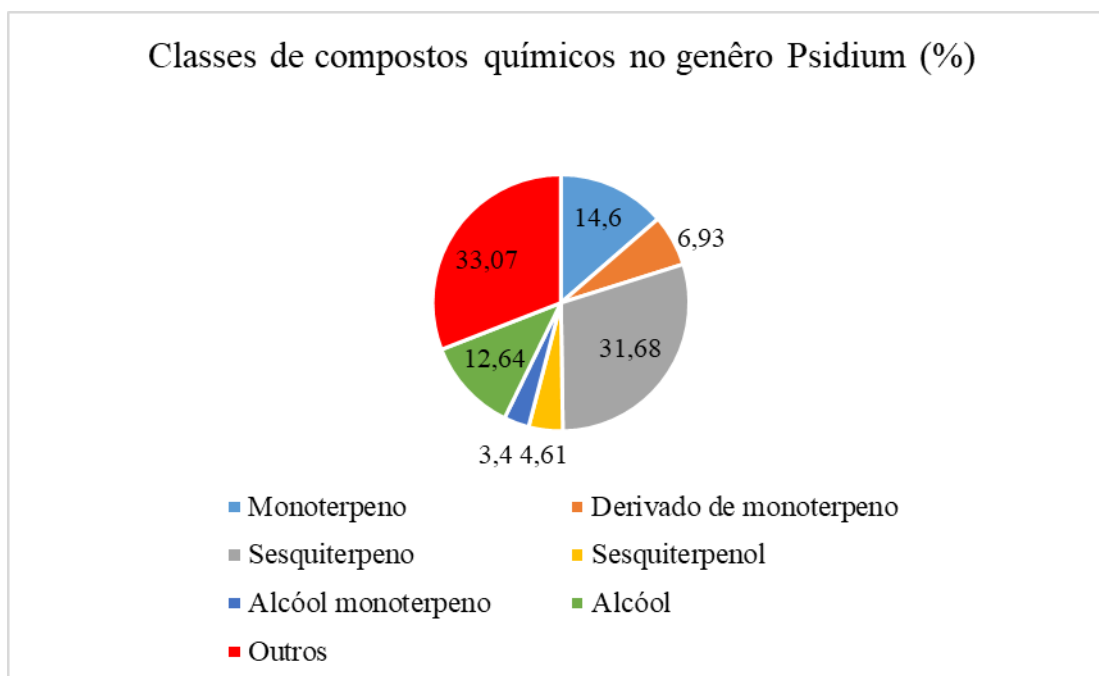
A frequência total dos sesquiterpenos no gênero *Psidium* é cerca de 36,29% (Figura 42), trazendo uma boa representatividade para esta classe dentro do gênero e da família Myrtaceae.

Figura 41-Representação dos registros do gênero *Psidium* no EssoilDB: Compostos químicos mais frequentes e suas estruturas químicas



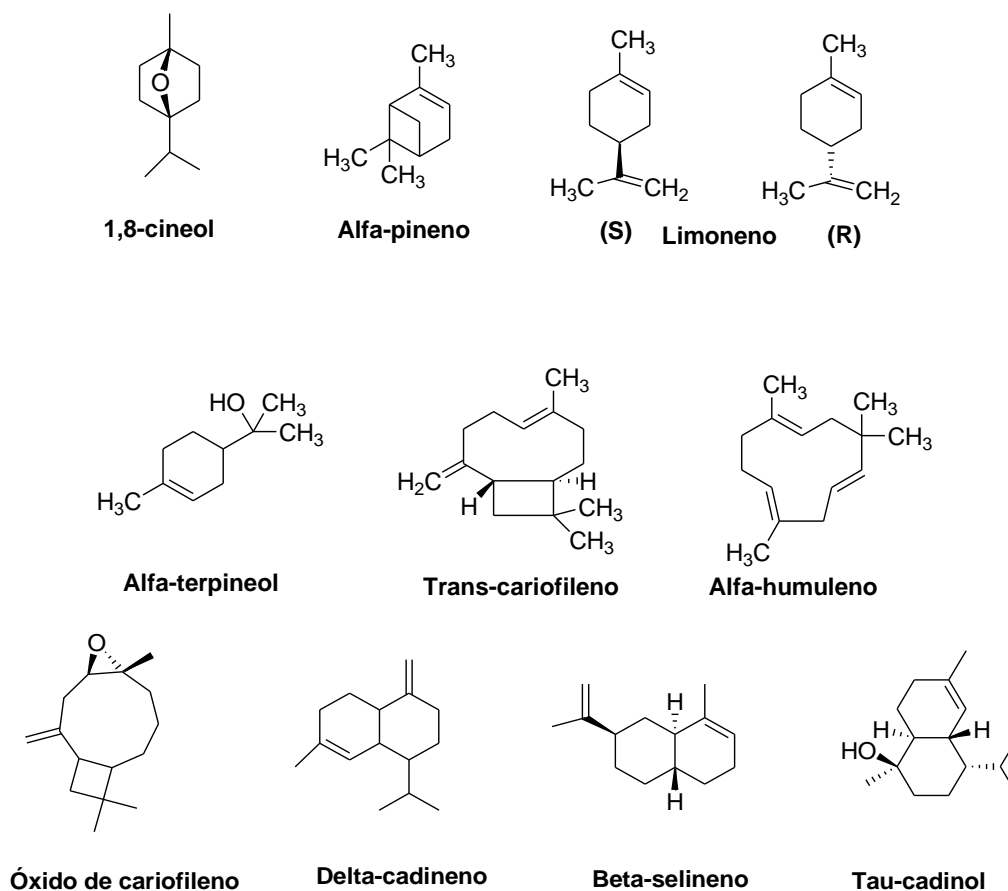
Fonte: Adaptado de ESSOILDB (2018).

Figura 42-Classe de Compostos químicos descritos do gênero *Psidium* no EssoilDB



Fonte: Adaptado de ESSOILDB (2018).

Figura 43- Representação dos registros do gênero *Psidium* no EssoilDB: Espécies, compostos químicos e suas estruturas químicas



Fonte: Adaptado de ESSOILDB (2018).

Dentro desse contexto, foi possível verificar através do banco de dados da *EssOilDB* que o trans-cariofileno é o primeiro composto químico mais abundante presente no óleo volátil do gênero *Psidium*, e em concordância com o presente trabalho, também da espécie *P. myrtoides* O. Berg. Ainda no contexto das informações apresentadas no banco de dados, o gênero *Psidium* apresenta o óxido de cariofileno como quarto composto mais abundante, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho para a espécie *P. myrtoides*.

Conforme reportado por CARNEIRO et al. (2010), que estudou a *Plectranthus amboinicus*, deduziu que a maior concentração de trans-cariofileno (%) em função das condições experimentais ocorreu na condição de maior exposição solar. O contrário foi observado com os resultados demonstrados na tabela 8, de modo que o óleo extraído da folha fresca e seca no período seco (Período de menor exposição solar), apresenta concentração maior de trans-cariofileno (%).

Outra observação importante é o aumento de óxido de cariofileno na composição do óleo volátil da folha seca (13,59%) em relação ao óleo extraído da folha fresca (7,69%), no período seco. Segundo a revisão feita por Turek e Stintzing (2013), o óxido de cariofileno é um metabólito secundário estável resultante da auto-oxidação do trans-cariofileno. Embora, a auto-oxidação tenha sido particularmente estudada no campo dos óleos graxos, desempenha um papel de grande importância para deterioração dos terpenóides. A partir desta análise feita por Turek e Stintzing podemos sugerir que os componentes químicos do óleo volátil da *P. myrtoides*, como trans-cariofileno, podem ter sofrido uma auto-oxidação maior na folha fresca durante o período de seca, gerando uma quantidade maior na composição de óxido de cariofileno. Fatores que influenciam a auto-oxidação dos óleos voláteis são: luz, temperatura, acessibilidade ao oxigênio do ar, e impurezas também podem influenciar diretamente a estabilidade do óleo volátil (TUREK; STINTZING, 2013).

Entretanto, os resultados expressos na composição do óleo volátil dependem de um conjunto de fatores, tanto abióticos como bióticos, não podendo ser atribuído apenas aos fatores mencionados anteriormente, mas a uma rede complexa de fatores e/ou condições ambientais (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2017).

Este resultado também pode ter relação com as cavidades secretoras quando é realizada a secagem das folhas, fazendo com que alguns compostos se evidenciem mais que os outros em detrimento da disponibilidade destes na superfície ou no interior foliar, que está associada a produção de metabólitos secundários mais fortemente de acordo com a época do ano. Conforme foi reportado por PIMENTEL et al. (2012), pode ocorrer diminuição na quantidade de voláteis do material seco, que está relacionada a perda dos compostos armazenados em estruturas internas, como cavidades secretoras ou células oleíferas, que podem ser arrastadas pelos vapores de água durante o processo de secagem, uma vez que a água pode atuar como solvente, e o vapor produzido durante a secagem das folhas se torna o agente carreador dos compostos lipofílicos.

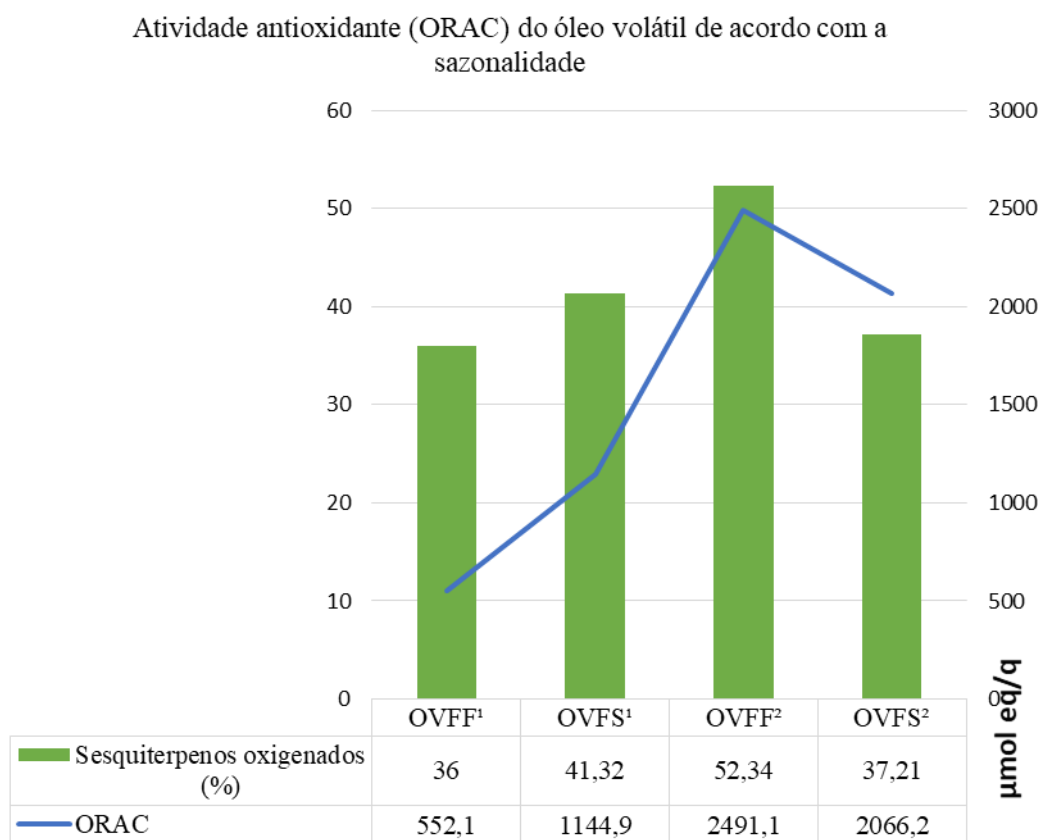
Dentro deste contexto, esta explicação da diminuição na quantidade de voláteis do material seco pode estar associada a perda significativa do óxido de cariofileno (20,66%) para (11,41%), respectivamente, do OV da folha fresca e OV da folha seca, relacionando o seu armazenamento em estruturas internas. Também há possibilidade de invés de diminuir, pode aumentar o teor de óleo volátil produzido, que pode ocasionar a ruptura de tecidos e, conseqüentemente, de estruturas secretoras, resultando no extravasamento dos compostos presentes no interior da folha, incluindo os constituintes voláteis.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante (ORAC) do óleo volátil

Conforme descrito na literatura, os principais componentes dos óleos voláteis podem ser classificados em duas famílias estruturais em relação ao esqueleto de hidrocarbonetos, isto é, terpenos oxigenados ou não oxigenados. Os terpenóides podem ser formados pela combinação de dois (monoterpenos), três (sesquiterpeno), ou quatro (diterpeno) unidades de isoprenos. De acordo com alguns resultados na literatura, foi demonstrado que a capacidade antioxidante e antimicrobiana dos óleos voláteis está diretamente ligada aos terpenos oxigenados (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013). Conforme a figura 44, podemos verificar o desempenho da atividade antioxidante pelo método ORAC dos óleos voláteis da *Psidium myrtoides* produzidos em duas estações do ano e tipos de secagem. Segundo reportado por Amorati, Foti, e Valgimigli (2013), os óleos voláteis apresentam desempenhos melhores quando estão presentes na sua composição terpenóides oxigenados.

Conforme os resultados da figura 44, o óleo volátil extraído no período de chuva (OVFF²) apresentou maior presença de sesquiterpenos oxigenados (52,34%) e, portanto, maior potencial antioxidante. O menor desempenho foi para o (OVFF¹) obtido no período de seca da folha fresca. Porém, o desempenho do OV é o resultado de uma complexa interação entre os seus constituintes químicos com os radicais livres. O óleo volátil obtido no período chuvoso extraído da folha seca (OVFS²) apresentou um menor percentual de sesquiterpenos oxigenados. Porém, teve um desempenho antioxidante relativamente alto, isto é, não é possível inferir com precisão que sejam apenas essa família de hidrocarbonetos responsável pela ação observada, pois o efeito antioxidante dos óleos voláteis, muitas vezes, decorre do sinergismo existente entre todas as substâncias presentes (CANDAN et al., 2003). A ordem crescente de atividade antioxidante observada se dá da seguinte maneira: OVFF¹< OVFS¹<OVFF²<OVFS².

Figura 44-Atividade antioxidante (ORAC) do óleo volátil de acordo com a sazonalidade



Legenda: OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca; ² Período de chuva.

5.4 Avaliação da atividade antibacteriana

Baseado em um critério estabelecido por MACHADO et al. (2005), para classificar os O.V's são atribuídos valores de MIC dentro de uma escala. Os óleos voláteis que apresentam excelente atividade antibacteriana; apresentam MIC menor que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Valores de MIC entre $10-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados bons; valores entre 100 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados moderados; valores entre 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados baixos, e para valores de MIC acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, essas amostras são consideradas inativas.

Na tabela 11 estão demonstradas as atividades antibacterianas para o óleo volátil de *P. myrtoïdes*. O óleo volátil extraído do período de seca apresentou atividade moderada para as bactérias *Streptococcus sanguinis* ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Streptococcus mutans* ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foi inativo para *Streptococcus mitis* dentro do intervalo das concentrações testadas. O óleo volátil extraído no período apresentou atividade moderada apenas para *S. sanguinis* com MIC de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. No estudo de Dias et al. (2018), o óleo das folhas de *P. myrtoïdes* O. Berg indicou atividade para estas mesmas bactérias com MIC's entre $62,5$ e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com relação às bactérias bucais anaeróbias os OV's do período de seca e período chuva não evidenciaram nenhuma atividade relevante dentro do intervalo testado ($0,0139 - 400 \mu\text{g mL}^{-1}$). O mesmo ocorreu quando foram testadas as bactérias *Streptococcus aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Foi reportado por MARTINS et al. (2015), que a atividade antimicrobiana contra patógenos humanos gram-positivos e gram-negativos pode ser explicada pela presença de metabólitos secundários como sesquiterpenos presentes em altas concentrações no óleo volátil. Numa revisão realizada na literatura por LANG e BUCHBAUER (2012), foi reportado a diferença entre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Bactérias gram-negativas possui uma bicamada lipídica, e os constituintes do óleo como são hidrofóbicos possuem maior dificuldade de penetrar e estabelecer um contato mais efetivo com a dupla membrana das bactérias gram-negativas. As bactérias gram-positivas apresentam apenas uma camada lipídica, isto reflete no desempenho dos óleos voláteis, e isto é em parte, justifica o resultado para *Streptococcus sanguinis* ser moderado. Essa diferença na atividade pode estar relacionada também com variações qualitativas e quantitativas na composição química dos óleos voláteis. Isto ocorre provavelmente por muitos fatores que pode influenciar a composição química dos óleos como: características do solo, sazonalidade, intensidade da luz,

condições climáticas, fatores genéticos e técnicas de extração (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2017).

Tabela 11- Resultados da atividade antibacteriana (CIM) in vitro dos óleos voláteis da *Psidium myrtooides*

Microorganismo	Concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g mL}^{-1}$)						Controle Clorexidina $\mu\text{g mL}^{-1}$
	Amostra						
Aeróbias	Óxido de Cariofileno	Trans Cariofileno	OVFF ¹	OVFS ¹	OVFF ²	OVFS ²	
<i>Streptococcus mutans</i> ^b (ATCC 25175)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,922
<i>Streptococcus mitis</i> ^b (ATCC 49456)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	3,688
<i>Streptococcus sanguinis</i> ^b (ATCC 10556)	>400	>400	200	200	200	200	0,922
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (ATCC 43717)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,460
							Cloranfenicol $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	>400	>400	>400	>400	-	-	6,75
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	>400	>400	>400	>400	-	-	3,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>400	>400	>400	>400	-	-	12,5
							Metronidazol $\mu\text{g mL}^{-1}$
Anaeróbias <i>Porphyromonas gingivalis</i> ^a (ATCC 33277)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	0,0115 a 5,9
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ^a (ATCC 25586)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	
<i>Actinomyces naeslundii</i> ^b (ATCC19039)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	

^a Gram-negativa; ^b Gram-positiva. OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca; ² Período de chuva.

5.5 Avaliação da atividade antifúngica

De acordo com a literatura, classificou-se a atividade antifúngica dos óleos essenciais em forte (até 500 $\mu\text{g/mL}$), moderada (entre 500 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), fraca (maior que 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (SARTORATTO et al., 2004).

Analisando a tabela 12, podemos verificar que a atividade antifúngica para *C. glabrata* de acordo com a classificação foi forte para os voláteis (folha fresca e seca no período seco) com CIM respectivos, de 187,5 e de 46,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com atividade moderada para óxido de carofileno e, com atividade fraca para o trans-carofileno.

As atividades antifúngicas para *C. albicans*, dos óleos voláteis (OVFS¹ e OVFF¹), do trans-carofileno, e do óxido de carofileno, apresentaram um efeito fúngico fraco, com CIM igual a ($\geq 3000 \mu\text{g mL}^{-1}$). As atividades antifúngicas para *C. tropicalis*, apresentou-se entre moderada e fraca, atividade para os óleos voláteis (OVFS¹ e OVFF¹), com CIM igual a (1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para o trans-carofileno apresentou atividade moderada (750 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e para o óxido de carofileno CIM $> 3000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O resultado para *C. glabrata* (187,5 e 46,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no presente estudo é importante e expressivo visto que é uma levedura do ambiente hospitalar, a qual apresentou uma das maiores resistências ao fluconazol (64,7%) segundo o estudo apontado por Furlaneto e colaboradores (2011). Outras pesquisas já apontam que cerca de 10% da *C. glabrata* apresentam resistência ao fluconazol, e cerca de 52% são resistentes ao itraconazol, e também podem ser mostrar resistentes a anfotericina B (DIEKEMA et al., 2002).

Os azóis (fluconazol, itraconazol, outros) que são utilizados no tratamento convencional para tratar os fungos, eles inibem a síntese de ergosterol dos fungos através da ligação com a enzima lanosterol 14- α -demetilase, o que provoca alterações na membrana citoplasmática fúngica, podendo reduzir ou desencadear o aumento da produção da enzima. A anfotericina B também é um fungicida/parasiticida que também atua se ligando preferencialmente ao ergosterol da membrana celular de fungos e protozoários, alterando a permeabilidade de membrana e causando extravasamento dos componentes intracelulares (HAMILL, 2013).

Tabela 12-Resultados de leveduras (CIM) in vitro dos óleos essenciais da *Psidium myrtooides*

Amostra	Concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Microorganismo		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 28366	<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803
Óxido de Carofileno	>3000	750	>3000
Trans-Carofileno	>3000	>3000	750
OVFF ¹	3000	187,5	1500
OVFS ¹	3000	46,9	1500
OVFF ²	1500	187,5	375
OVFS ²	1500	375	750

OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca; ² Período de chuva.

5.6 Avaliação da atividade antiprotozoário e citotoxicidade

Os dados da atividade leishmanicida e citotoxicidade foram obtidos a partir dos gráficos de viabilidade celular. Os resultados obtidos para todos os OV's foram correlacionados através do cálculo do índice de seletividade (IS) (Tabela 13).

Tabela 13-Resultados da atividade leishmanicida e tripanossomicidas (CI_{50}) in vitro, citotóxicidade (CC_{50}) e Índice de Seletividade (IS) dos óleos essenciais da *Psidium myrtooides*

Amostra	Espécie protozoário		Concentração citotóxica		IS ³
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>	(CI_{50}) $\mu\text{g mL}^{-1}$	(CC_{50}) $\mu\text{g mL}^{-1}$	
OVFF ¹	796,3 \pm 8,93	Não tóxico	58,99 \pm 10,41	-1,13	-
OVFS ¹	54,05 \pm 5,25	Não tóxico	71,77 \pm 6,41	0,12	-
OVFF ²	Não tóxico	31,8 \pm 5,74	53,79 \pm 6,55	-	0,23
OVFS ²	Não tóxico	55,7 \pm 7,86	66,57 \pm 1,685	-	0,08

OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca; ² Período de chuva. ³ IS= Índice de seletividade.

A partir dos ensaios *in vitro* é possível calcular a concentração que determina 50% de viabilidade celular (CC₅₀), e fazer a relação com valores de IC₅₀ para o cálculo do índice de seletividade (IS). O IS é calculado pelo logaritmo da razão entre CC₅₀ e o valor de IC₅₀ (IS = log [CC₅₀ vero cells]/[IC₅₀]). Quanto mais seletivo for o óleo volátil da planta em relação à equação, produzirá um valor de SI entre 2 e -2. Um valor positivo representa maior seletividade contra microorganismos do que toxicidade celular, e um valor negativo, menor seletividade pelos microorganismos e maior citotoxicidade (CASE et al., 2006).

De acordo com os resultados da tabela 13 no período de seca, o OVFS¹ apresentou menor valor de IC₅₀ para *T. cruzi* e o OVFF¹ apresentou maior IC₅₀. Isso significa que para ensaio com OVFF¹ é preciso uma maior concentração para inibir 50% dos parasitas. Segundo Case e colaboradores (2006), o OVFF¹ é mais tóxico do que seletivo para o parasita, de acordo com o valor negativo calculado do IS na tabela 13. Para os OVFF² e OVFS² obtidos no período de chuva não houve inibição contra *T. cruzi* na concentração testada.

Para os resultados *L. amazonensis* as amostras OVFF¹ e OVFS¹ não apresentaram inibição contra o parasita na concentração testada. Já as amostras OVFF² e OVFS² apresentaram baixos valores de IC₅₀. Avaliando-se o IS para os óleos do período de chuva, os valores são positivos, demonstrando que, apesar do baixo valor de IS, são seletivos para inibir o parasita. Dentro deste contexto o OVFS¹, OVFF², e OVFS² mostrou um caráter promissor para a busca de um fitoterápico que possa ser eficiente e que não apresentem efeitos colaterais no tratamento da leishmaniose e doença de chagas.

Outra perspectiva de discussão é a composição química e a classe de compostos presentes no óleo volátil. Os terpenos possuem características hidrofóbicas. A lipofilicidade de um composto depende de várias características, volume molecular, polaridade, etc. A toxicidade dos óleos voláteis vai depender da classe de terpenos que o constituem, pois disto determinará a interação que os óleos voláteis terão com a membrana da célula do protozoário. Desta ação, poderá haver rompimento da membrana lipídica, causa da interação dos componentes hidrofóbicos com o microorganismo (SIKKEMA, 1995).

Estudos realizados por Da Silva e colaboradores (2018) avaliou a susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Esses autores relataram que, nos testes *in vitro*, os monoterpenos são mais eficazes que os sesquiterpenos contra as formas de *L. amazonensis*, porém no estudo desenvolvido, o óleo volátil mais efetivo foi o que continha 67 vezes menos monoterpenos (DA SILVA et al., 2018).

Já outros estudos na literatura comprovam que a inibição dos protozoários, provém dos sesquiterpenos. Por exemplo, é o caso do componente químico α -bisabolol, que existe a

comprovação da sua atividade leshimanicida e tripanossomicida realizada a partir de ensaios. ROTTINI et al., (2015) relataram a inibição de *L. amazonensis* a partir do α -bisabolol, que ocorreu em 24h, alcançando um valor IC_{50} igual a $8,07 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, há outros óleos voláteis pertencentes à família Myrtaceae que possuem baixo percentual de α -bisabolol, e possuem um efeito de inibição forte contra *L. amazonensis* (DA SILVA et al., 2018).

Soares e colaboradores (2013) apontaram que o trans-cariofileno (composto majoritário), do óleo de copaíba é o responsável pela atividade anti-leishmanicida. Foram estudadas 4 amostras de óleos de copaíba diferentes e, dentre elas, as amostras C1 (44,2%) e C4 (36,5%) foram as que mais apresentaram trans-carofileno na sua composição, apresentando IC_{50} iguais a 2,9 e $2,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já o trans-carofileno na sua forma isolada apresentou IC_{50} igual a $1,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SOARES et al., 2013).

5.7 Avaliação de inibição enzimática e estudo de docking molecular

No presente trabalho, os resultados do teste para verificar a inibição das amostras de óleo volátil obtidas das folhas de *P. myrtooides* sobre a enzima α -amilase são expressos em porcentagem de inibição enzimática (%). A concentração das amostras testadas e do controle positivo utilizado no teste foi $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados de atividade enzimática da alfa-amilase estão expostos na tabela 14. Os maiores valores de porcentagem de inibição enzimática indicam melhor atividade da amostra em inibir a α -amilase. Porém, todos percentuais de inibição enzimático das amostras dos óleos voláteis foram inferiores àqueles apresentados pelo controle positivo, a acarbose ($99,9 \pm 1,2$).

Tabela 14- Resultados de inibição enzimática da alfa-amilase pelas amostras de óleo volátil das folhas frescas e secas a partir do estudo sazonal

Amostra	Inibição de alfa-amilase (%)	
	período seca	período de chuva
OVFF ¹	$17,3 \pm 2,8$	-
OVFS ¹	$10,1 \pm 3,9$	-
Acarbose	$99,9 \pm 1,2$	$99,9 \pm 1,2$
OVFF ²	-	$6,8 \pm 3,5$
OVFS ²	-	$4,7 \pm 3,0$

OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca (Setembro 2017); ² Período de chuva.

Os resultados enzimáticos expressos na tabela 14 serão discutidos por meio de dois caminhos: Utilizando *docking* molecular e, a mudança na composição química do óleo volátil com a influência sazonal.

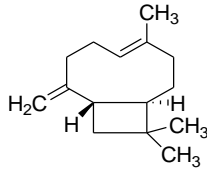
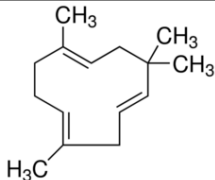
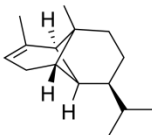
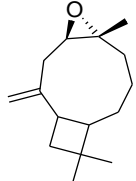
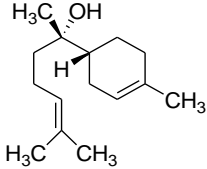
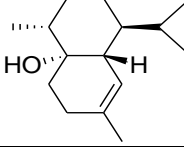
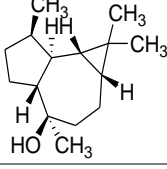
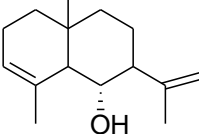
Primeiro, vamos abordar a discussão com os resultados de *docking* molecular. Os cálculos de energia de ligação (kcal/mol) foram realizados através do software *Arguslab 4.0*, e através da relação com a equação da Energia Livre de Gibbs (ΔG), a constante de inibição (K_i) foi obtida.

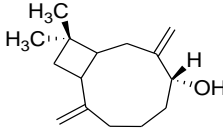
Os compostos majoritários do óleo volátil da *P. myrtoides* que foram identificados nas duas épocas do ano para todos óleos produzidos no presente trabalho, foram considerados como candidatos a inibidores, são eles: trans-cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno e α -bisabolol e α -copaeno (Conforme descrito na tabela 15).

Já os componentes químicos (não-majoritários) que foram identificados apenas nos óleos voláteis obtidos na época de seca, também foram testados como candidatos a inibidores, são eles: Cubenol, globulol, cariofila-4(12),8(13)-dien-5- α -ol, e selina-3,11-dien-6- α -ol (Conforme descrito na tabela 13).

A partir desses constituintes químicos do óleo volátil da *P. myrtoides* mencionados e apresentados na tabela 15, podemos discutir como esses resultados de energia de ligação (kcal/mol) e de constante de inibição (K_i influenciam, ou não, na atividade enzimática com a alfa-amilase salivar.

Tabela 15-Resultados de docking molecular e alguns IC₅₀ da α-amilase com os constituintes químicos do óleo volátil da *P. myrtooides*

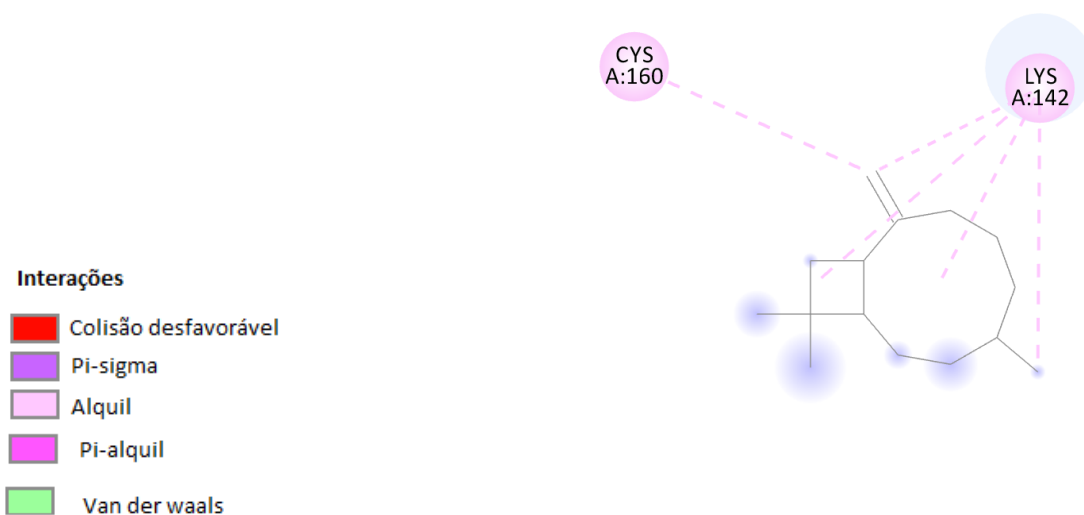
Época	Compostos Químicos	Estrutura (Ligantes)	ΔGb ¹ (kcal/mol)	Ki ² (μM)	In vitro IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)
Chuva e Seca	**trans-cariofileno		-6,46	18,4	<1
	α-humuleno		-7,22	5,09	-
	α-copaeno		-7,19	5,4	-
	**óxido de cariofileno		-4,13	9,38 x10 ²	<1
	α-bisabolol		-6,29	24,5	-
	cubenol		-7,32	4,30	-
	Seca	globulol		-7,13	5,9
selina-3,11-dien-6-α-ol			-7,27	4,68	-

	cariofila - 4(12), 8(13)- dien-5- α - ol		-7,48	3,29
Controle positivo	acarbose	-	-	0,05 \pm 0,01

Legenda: ¹Valores teórico constante de inibição (Ki). ^{**}Padrão Sigma-Aldrich. ¹ ΔG_b é a energia livre de ligação; ²Ki é a constante de inibição do ligante; ΔG_b foi calculado pelo Arguslab 4.0.

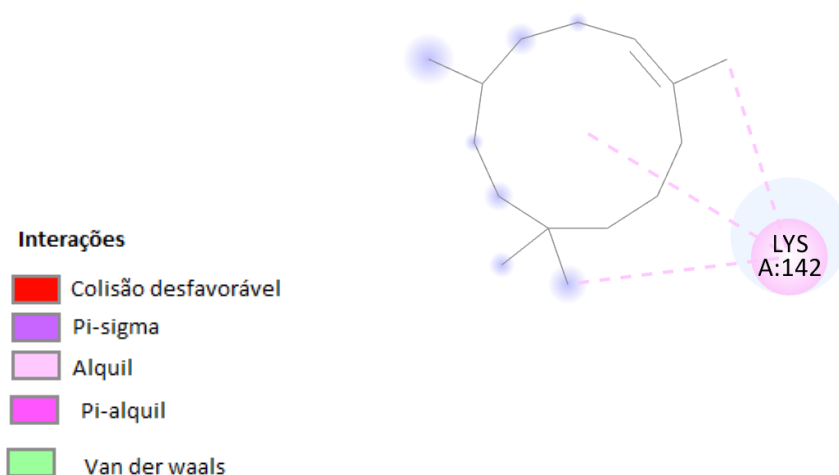
O ligante trans-cariofileno (-6,46 kcal/mol), com constante de inibição (18,4 μ M), apresentou ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil com CYS-160 e LYS-142, conforme figura 45.

Figura 45-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante trans-cariofileno e os principais aminoácidos, interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



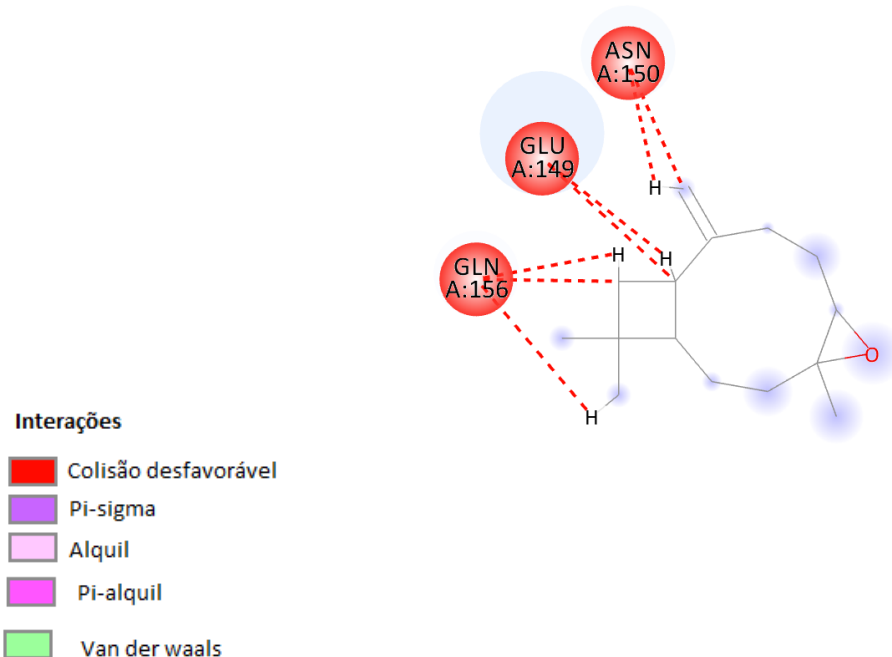
O *docking* com o ligante α -humuleno possui uma energia livre de ligação (-7,22 kcal/mol), com constante de inibição (5,09 μ M), e apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil com LYS-142, conforme figura 46.

Figura 46-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -humuleno e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



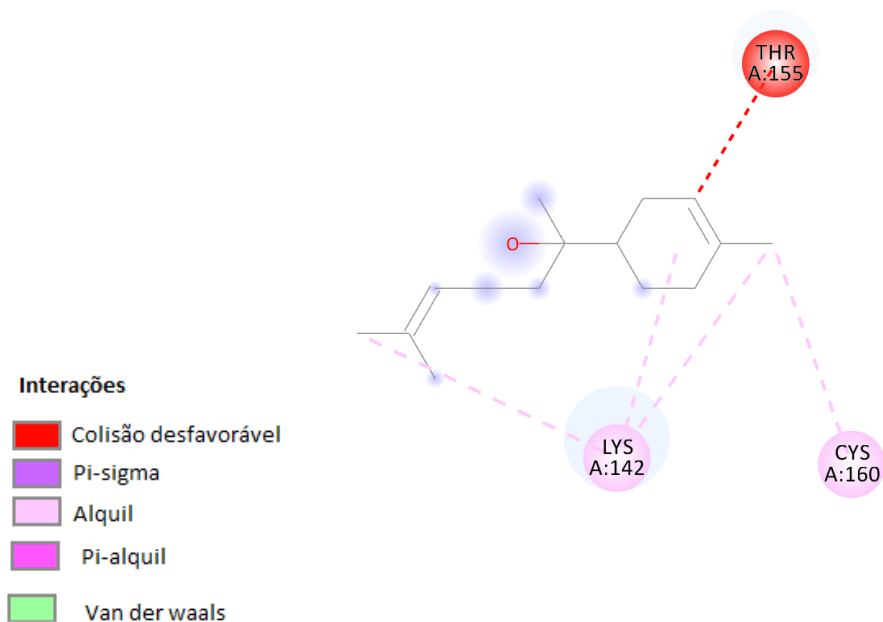
O *docking* com o ligante óxido de cariofileno possui uma energia livre de ligação (-4,13kcal/mol), com constante de inibição (935,0 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo colisão desfavorável com GLN-156, GLU-149 e ASN-150 , conforme figura 47.

Figura 47-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante óxido de Cariofileno, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



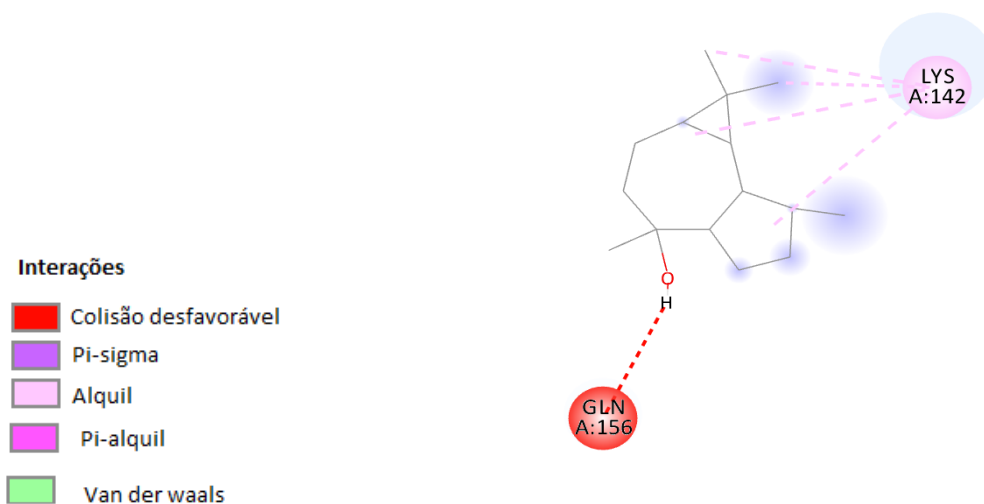
O ligante alfa-bisabolol, apresentou uma energia de ligação $-6,29$ kcal/mol e constante de inibição de $24,5 \mu\text{M}$ no sítio ativo da enzima alfa-amilase. Apresentando interações do tipo alquil no resíduo LYS-142 e CYS-160, e uma interação desfavorável THR-155 conforme figura 48.

Figura 48-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante alfa-bisabolol, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



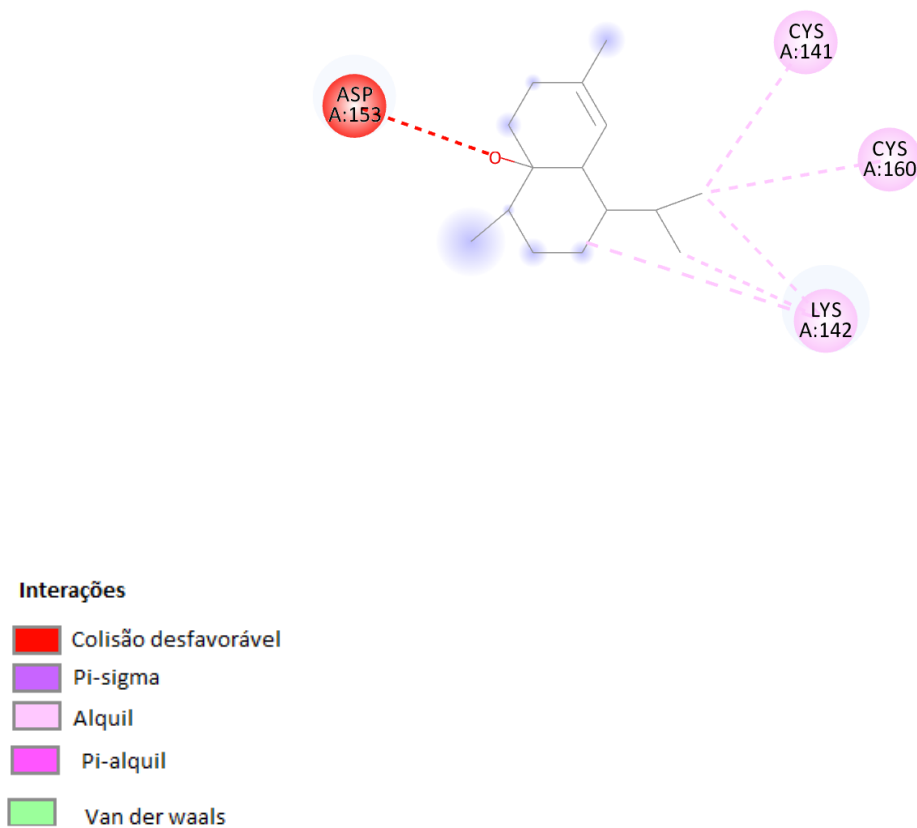
A figura 49 mostra o globulol (-7,13 kcal/mol), com constante de inibição ($5,9 \mu\text{M}$), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Ligação do tipo alquil com LYS-142 e ligação desfavorável com GLN-156.

Figura 49-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante globulol, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



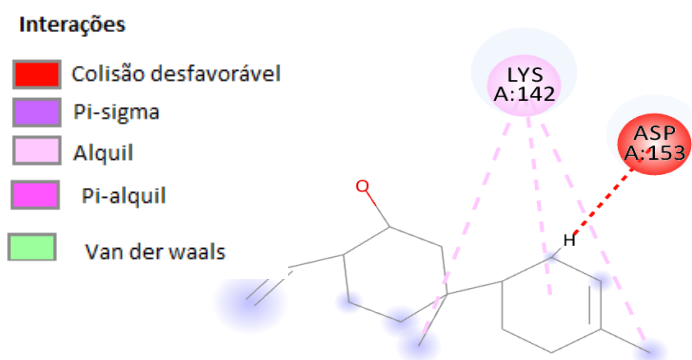
O cubenol com energia de ligação (-7,32 kcal/mol) e constante de inibição (4,30 μ M), apresentou ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interação do tipo alquil com CYS-141, CYS-160 e LYS-142 e uma ligação desfavorável com ASP-153 conforme figura 50.

Figura 50-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante cubenol e os principais aminoácidos, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



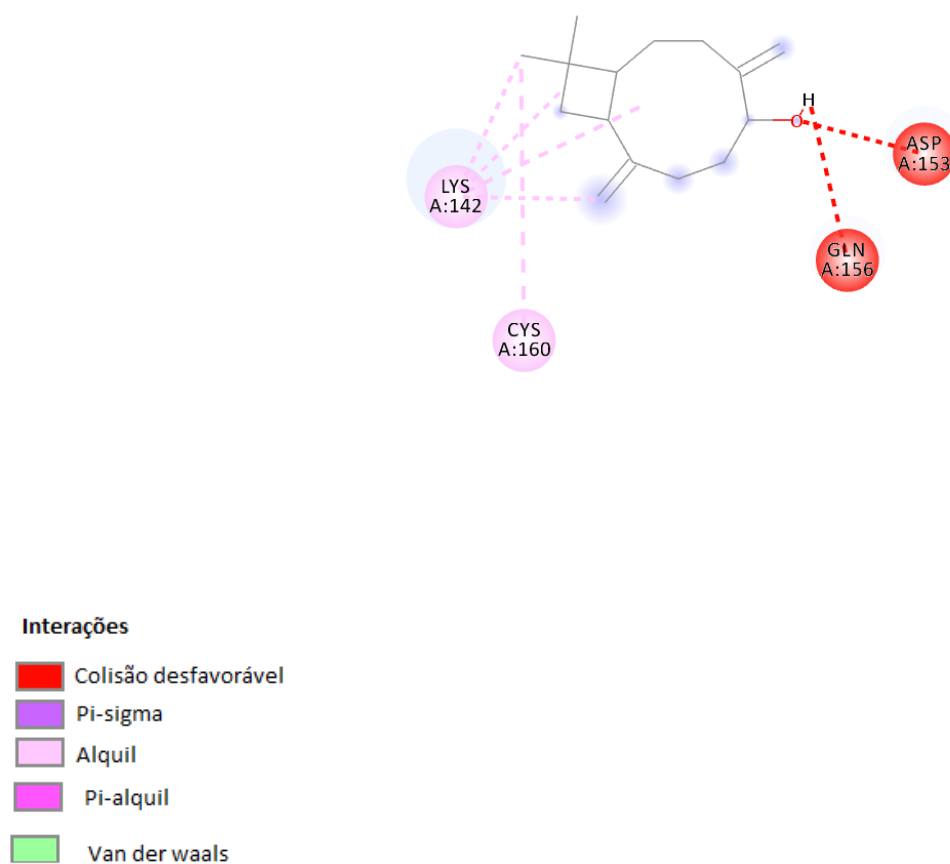
A Selina-3,11-dien-6- α -ol apresentou uma energia de ligação $-7,27$ kcal/mol e constante de inibição de $4,68 \mu\text{M}$ no sítio ativo da enzima alfa-amilase, apresentando interações do tipo alquil LYS-412 e uma ligação desfavorável com APS-153 conforme figura 51.

Figura 51-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante selina-3,11-dien-6- α -ol, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



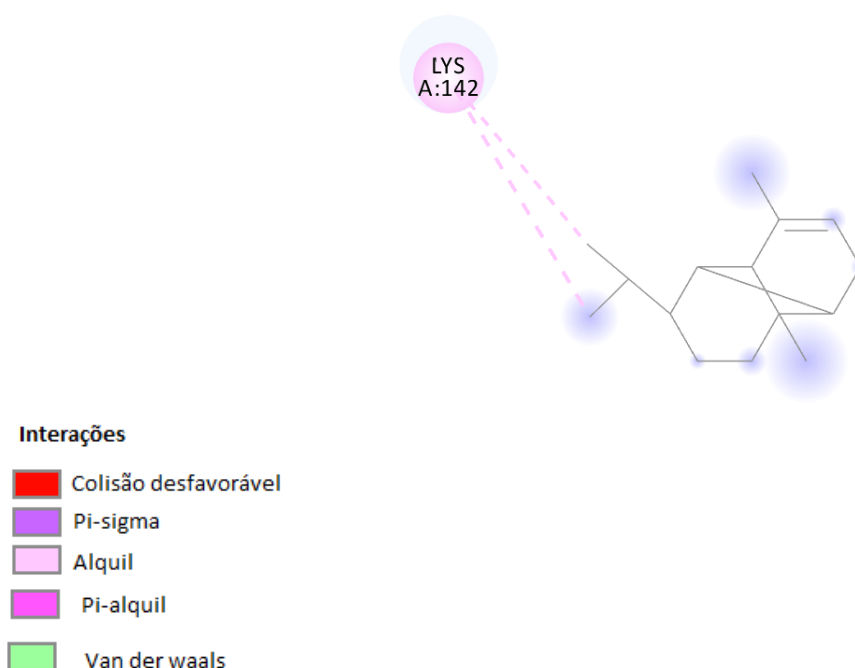
A Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol (-7,48 kcal/mol), com constante de inibição (3,29 μ M), apresentou ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interação do tipo alquil com LYS-142 e CYS-160, e desfavorável com GLN-156 e ASP-153 conforme figura 52.

Figura 52-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



O α -copaeno (-7, 19 kcal/mol), com constante de inibição (5,4 μ M), apresentou ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interação do tipo alquil com LYS-142 conforme figura 53.

Figura 53-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -copaeno, e os principais aminoácidos interagindo no local de ligação da enzima 1JXJ



Para entendermos a queda na taxa de inibição da alfa-amilase (%), temos que os constituintes químicos presentes nos dois períodos do ano são: trans-cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, α -copaeno, e α -bisabolol. Já os constituintes químicos presentes apenas no período seco são: cubenol, globulol, e selina-3,11-dien-6- α -ol e cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol. Assim, ocorre que para os óleos voláteis obtidos no período de seca, a taxa de inibição enzimática é 17,3% e 10,1%, folha fresca e folha seca, respectivamente. Para os óleos voláteis obtidos período de chuva, a taxa de inibição enzimática é 6,8% e 4,7%, folha fresca e folha seca, respectivamente. Há um decréscimo ainda maior da taxa (%) enzimática quando os compostos químicos globulol (0,65 %; 0,35%), cubenol (3,62%; 3,79%), selina-3,11-dien-6- α -ol (0,03%; 0,29%) e cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol (0,12%;0,24%), folha fresca e folha seca, respectivamente, desaparecem no período de chuva. A ausência desses sesquiterpenos oxigenados podem contribuir com a densidade eletrônica no sítio ativo por serem compostos polares, e a ausência deles pode influenciar a taxa de atividade enzimática (%).

Já o trans-cariofileno (-6,46 kcal/mol) e o óxido de cariofileno (-4,13 kcal/mol) foram testados *in vitro* com a alfa-amilase salivar, conforme a tabela 15 e, apresentaram ($IC_{50} = >1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Apesar de se mostrarem candidatos pelo *docking* de inibirem a enzima, não inibiram efetivamente, apresentando o óxido de cariofileno a maior constante de inibição (935,0 μM).

Avaliando pela perspectiva do *docking*, há poucas interações intermoleculares entre o complexo ligante-enzima, e nenhuma interação de ligação de hidrogênio, além de existirem interações desfavoráveis que podem contribuir para não formar o complexo ligante-enzima. Desta forma, justificando o resultado enzimático tão baixo para os compostos testados isoladamente como trans-cariofileno óxido de cariofileno.

Os resultados da análise de inibição da enzima α -glicosidase (tabela 16) são expressos em porcentagem de inibição (%). A concentração das amostras do OV e do controle positivo utilizado no teste foi 1 mg mL⁻¹.

Tabela 16-Inibição enzimática da α -glicosidase pelas amostras de óleo volátil

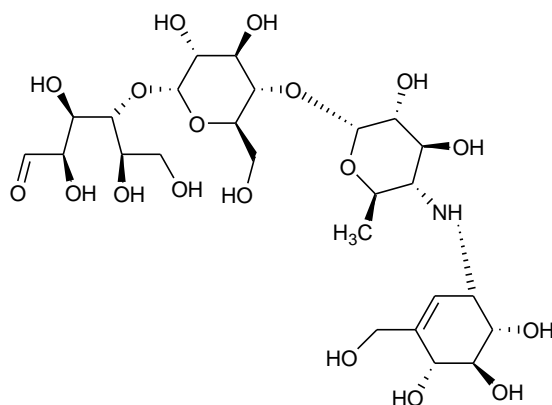
Amostra	Inibição alfa-glicosidase (%)
OVFF ¹	0,0
OVFS ¹	0,0
Acarbose	87,4 \pm 4,8
OVFF ²	14,8 \pm 3,3
OVFS ²	27,9 \pm 6,2

OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca (Setembro 2017); ² Período de chuva.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que as amostras de óleo volátil não apresentaram resultados satisfatórios para inibição da enzima α -glicosidase, sendo valores muito inferiores à da acarbose. Os óleos voláteis obtidos na época de seca (OVFF¹ e OVFS¹) não apresentaram nenhuma inibição. A maior inibição foi para o para OVFS² (27.9 \pm 6.2). Uma revisão da literatura revelou que terpenos, alcalóides, flavonóides e fenóis mostraram atividade inibitória potente em relação à α -glicosidase (YIN et al., 2015)

Ainda na literatura constam que as características de terpenos como por exemplo, posições e números de ligações duplas, posições de grupos adjacentes ou compostos cíclicos, podem favorecer a inibição das hidrolases glicosidases (BASAK; CANDAN, 2010). Apesar dessas características que os componentes do óleo essencial do *P. myrtoides* apresenta, os resultados demonstram que não houve superação na ação de inibição em comparação com o controle positivo, a acarbose (Figura 54).

Figura 54-Estrutura química da acarbose



Fonte: A autora (2019).

Os resultados da avaliação da inibição da enzima lipase (tabela 17) são expressos em porcentagem de inibição (%). As amostras de óleo volátil obtido das folhas secas e frescas e o controle positivo utilizado foram testados na concentração de 2 mg mL⁻¹.

Avaliando a taxa de inibição para lipase, os OV's obtidos das folhas frescas e secas, no período de seca, apresentaram, respectivamente, 39,8 e 34,4 (%) de inibição da lipase, conforme pode ser visto na tabela 17.

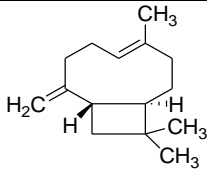
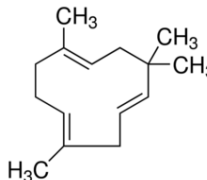
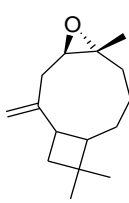
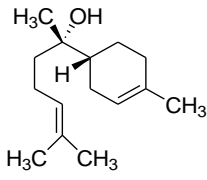
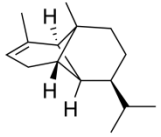
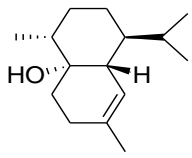
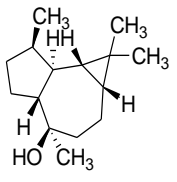
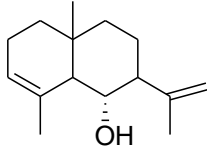
Tabela 17-Inibição de lipase pelas amostras de óleo volátil

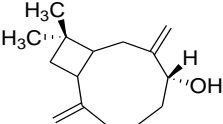
Amostras	Inibição lipase (%)
OVFF ¹	39,8 ± 3,0
OVFS ¹	34,4 ± 2,5
Orlistate	100,0 ± 0,0
OVFF ²	20,8 ± 2,2
OVFS ²	24,0 ± 2,2

OVFF= OV folha fresca; OVFS= OV folha seca; ¹ Período de seca (Setembro 2017); ² Período de chuva.

Os resultados de *docking* com a lipase pancreática (1LPB) estão expostos na tabela 18. Quanto menores os valores de Energia Livre Gibbs e as constantes de inibição (K_i) temos que os ligantes são potenciais candidatos para inibir a lipase.

Tabela 18-Resultados de docking molecular e alguns IC₅₀ da lipase com os constituintes químicos do óleo volátil da *P. myrtoïdes*

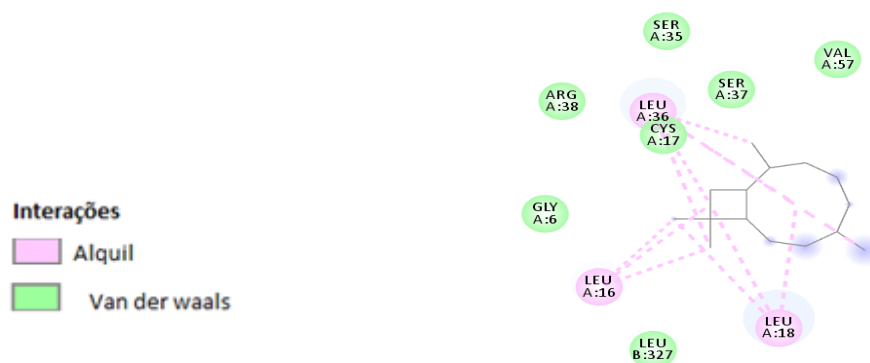
Época	Compostos Químicos	Estrutura (Ligantes)	ΔGb ¹ (kcal/mol)	Ki ² (μM)	In vitro IC ₅₀ (μg mL ⁻¹)
Chuva e seca	**trans-cariofileno		-8,08	1,18	<1
	α-humuleno		-8,12	1,10	-
	**óxido de cariofileno		-8,30	0,82	0.2092 ± 0.02
	α-bisabolol		-7,37	3,91	-
	α-copaeno		-7,30	4,45	-
	cubenol		-8,0	1,34	-
Seca	globulol		-7,76	2,02	-
	selina-3,11-dien-6-α-ol		-7,37	3,91	-

cariofila – 4(12), 8(13)- dien-5- α -ol		-8,00	1,35	-
Controle	Orlistate	-8,82	0,34	-

Legenda: ¹Valores teórico constante de inibição (Ki). ^{**}Padrão Sigma-Aldrich. ¹ ΔG_b é a energia livre de ligação; ²Ki é a constante de inibição do ligante; ΔG_b foi calculado pelo Arguslab 4.0.

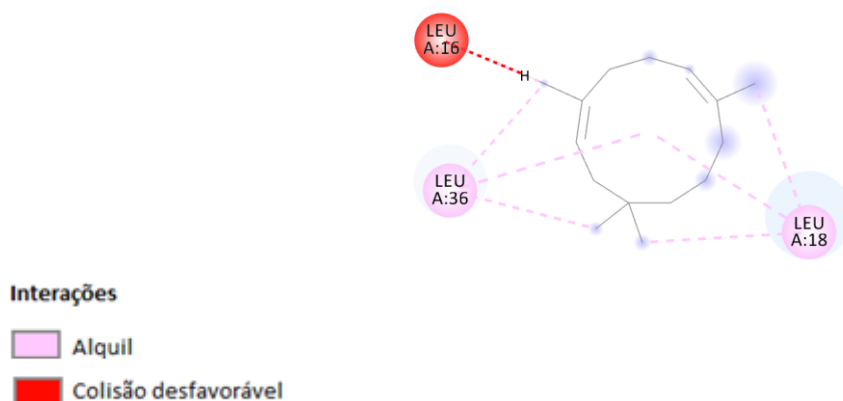
O docking com o ligante trans-cariofileno resultou em uma energia livre de ligação (-8,08 kcal/mol), com constante de inibição (1,18 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil com LEU-18, LEU-16, e LEU-36. Os resíduos SER-35, SER-37, VAL-57, CYS-17, ARG-38. GLY-6, e LEU-327 apresentam contatos próximos com o ligante através das ligações de Van der Waals, como demonstrado na figura 55.

Figura 55- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante trans-cariofileno e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



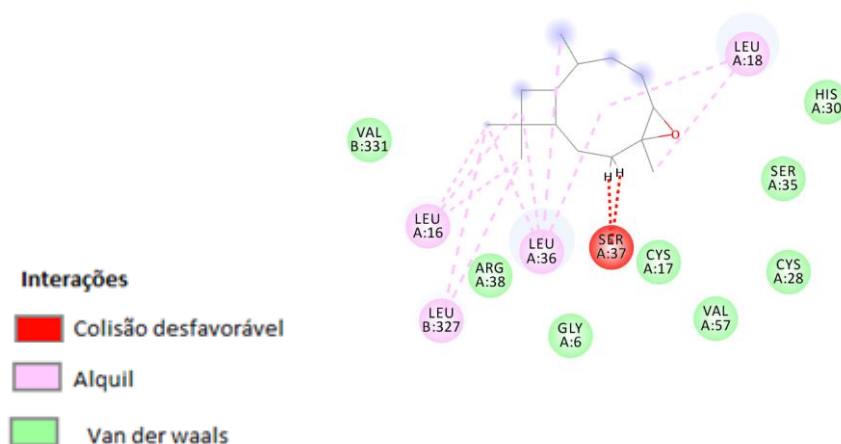
O docking com o ligante α -humuleno possui uma energia livre de ligação (-8,12 kcal/mol), com constante de inibição (1,10 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil com LEU-18, e LEU-36. O resíduo LEU-16 apresenta interação desfavorável como demonstrado na figura 56.

Figura 56-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -humuleno e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



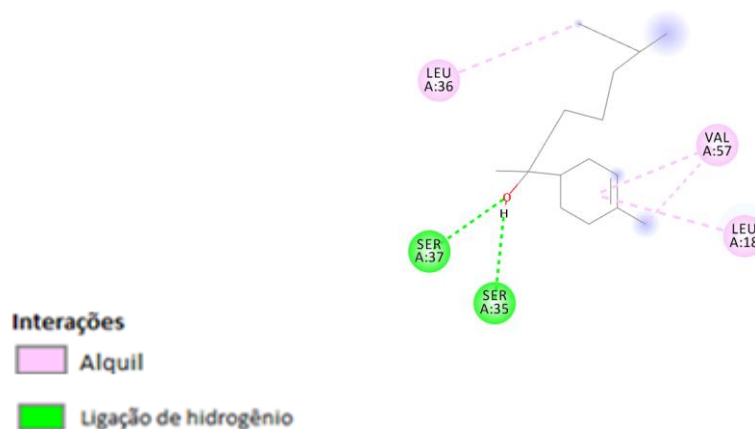
O docking com o ligante óxido de cariofileno possui uma energia livre de ligação (-8,30 kcal/mol), com constante de inibição (0,82 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil LEU-18, LEU-16, e LEU-36, e LEU-327. Os resíduos SER-35, VAL-57, CYS-17, ARG-38, CYS-28, GLY-6, HIS-30, e VAL-331 apresentam contatos próximos com o ligante através das ligações de Van der Waals e apresenta uma conformação desfavorável com o aminoácido SER-37, como demonstrado na figura 57.

Figura 57-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante óxido de cariofileno e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



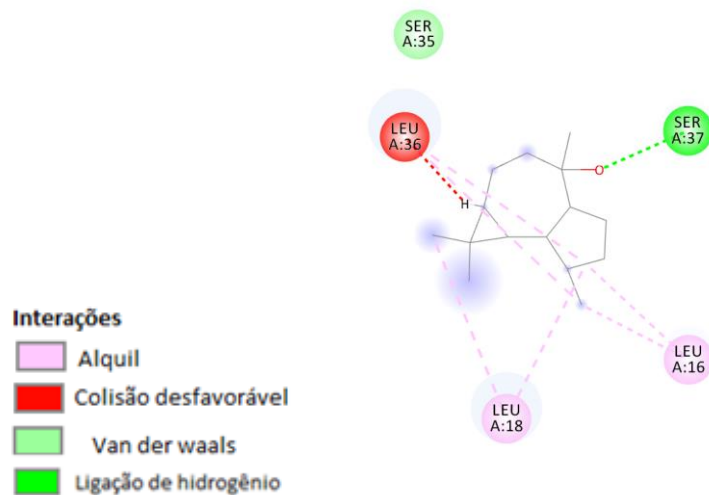
O docking com o ligante α -bisabolol possui uma energia livre de ligação (-7,37kcal/mol), com constante de inibição (3,91 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil VAL-57, LEU-18 e LEU-36. Com os aminoácidos SER-35 e SER-37 apresenta contato próximo através das ligações de hidrogênio conforme a figura 58.

Figura 58-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -bisabolol e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



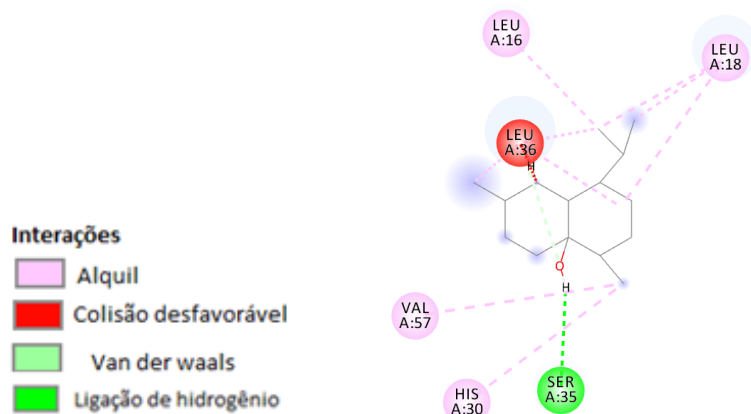
O docking com o ligante globulol possui uma energia livre de ligação (-7,76kcal/mol), com constante de inibição (2,02 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interações do tipo alquil LEU-16 e LEU-18. Com SER-35 apresenta contato próximo através das ligações de Van der Waals. Com o aminoácido SER-37 apresenta ligações de hidrogênio, e apresenta uma conformação desfavorável com o aminoácido LEU-36 conforme a figura 59.

Figura 59- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante globulol, e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



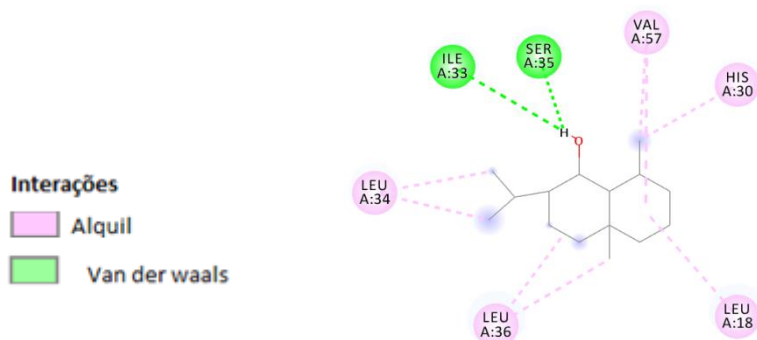
A figura 60 mostra o composto cubenol com baixa energia de ligação (-8,00 kcal/mol), e uma constante de inibição (1,34 μ M), apresentando ligações no sítio ativo com os seguintes resíduos de aminoácidos: Interação do tipo alquil LEU-18, LEU-16, VAL-57e HIS-30. Com o aminoácido SER-35 apresenta ligações de hidrogênio, e apresenta uma conformação desfavorável com o aminoácido SER-36.

Figura 60- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante cubenol, e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



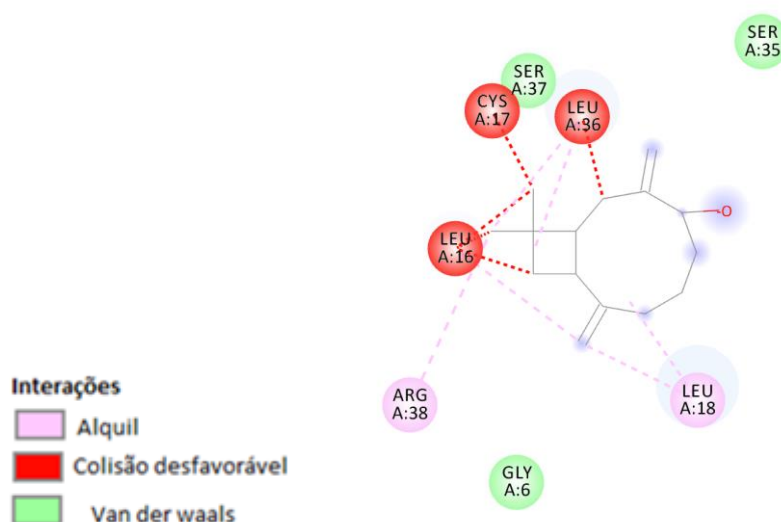
A figura 61 mostra o ligante selina-3,11-dien-6- α -ol, que apresentou uma energia de ligação $-7,37$ kcal/mol e constante de inibição de $2,48$ μ M no sítio ativo da enzima lipase, apresentando interações do tipo ligações de hidrogênio com o aminoácido SER-35 e ILE-33. Apresenta interações do tipo alquil VAL-57, HIS-30, LEU-18, LEU-36 e LEU-34.

Figura 61- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante selina-3,11-dien-6- α -ol, e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



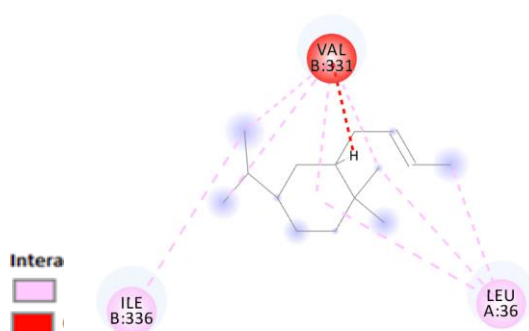
A figura 62 mostra o ligante Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol, que apresentou uma energia de ligação -8,00 kcal/mol e constante de inibição de 1,35 μ M no sítio ativo da enzima lipase. Os resíduos SER-35, SER-37, e GLY-6 apresentam contatos próximos com o ligante através das ligações de Van der Waals. Apresenta interações do tipo alquil ARG-38, e LEU-18. Apresenta interações desfavoráveis com os aminoácidos LEU-36, CYS-17 e LEU-16.

Figura 62-Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante Cariofila – 4(12), 8(13)-dien-5- α -ol e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



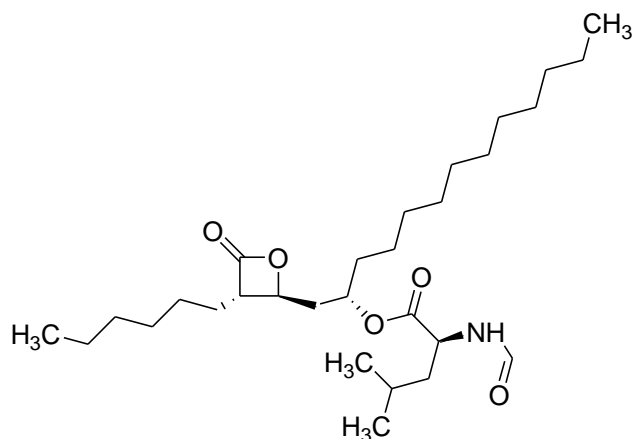
A figura 63 mostra o ligante α -copaeno que apresentou uma energia de ligação -7,30 kcal/mol e constante de inibição de 4,45 μ M no sítio ativo da enzima lipase. Apresenta interações do tipo alquil com LEU-36 e ILE-336. E apresenta uma ligação desfavorável com VAL-331.

Figura 63- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligante α -copaeno e os principais aminoácidos, interagindo do local de ligação da enzima 1LPB



A Orlistate (Figura 64) é um potente inibidor da enzima lipase pancreática isolada da bactéria *Streptomyces toxytricini*. Este medicamento de prescrição é projetado para tratar a obesidade, diminuindo a digestão lipídica e é produzido sob a nome comercial Xenical® da Roche. (AMIN et al., 2016).

Figura 64-Estrutura química da orlistate



Fonte: A autora (2019).

Esses resultados de inibição enzimática (%) apresentados na tabela 17 comparados ao controle Orlistate®, não torna os OV's da *P. myrtooides* um bom inibidor da enzima lipase.

Um estudo realizado por Jaradat e colaboradores (JARADAT et al., 2017) aponta que o extrato aquoso e orgânico das folhas de *Psidium guajava*, também da família Myrtaceae, apresentam inibição da lipase pancreática num intervalo de 87.1 e 64.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para as amostras. Nesta família estão presentes compostos químicos como flavonóides, taninos, triterpenos, sesquiterpenos, monoterpênos, os quais são responsáveis por atividades hipoglicêmicas, antiinflamatória, inibição da redutase da aldose e da α -glucosidase e também participam da inibição da enzima lipase (CASCAES et al., 2015; JARADAT et al., 2017). Embora estejam presentes apenas sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados no O.V da *P. myrtooides*, não foi observada uma inibição (%) expressiva da lipase pancreática pelos óleos voláteis.

Porém, os resultados (Tabela 18) demonstraram que todos os compostos presentes no óleo volátil são candidatos a inibir a lipase pancreática. Destacando-se o óxido de cariofileno (-8,30 kcal/mol) em termos de Energia Livre de Gibbs. O óxido de cariofileno (-8,30 kcal/mol) inibiu a lipase em 0.2092 $\mu\text{g mL}^{-1}$, aproximando-se muito do controle positivo orlistate, que inibiu a lipase em 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já o trans-cariofileno (8,08 kcal/mol) apresentou inibição a lipase em $>1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

6. CONCLUSÃO

O estudo da sazonalidade com óleos voláteis da *P. myrtoïdes* mostrou que os óleos apresentaram a mesma composição química, com variações apenas nas quantidades dos principais compostos identificados (sesquiterpenos hidrocarbonetados e oxigenados), demonstrando a estabilidade dos óleos voláteis desta espécie.

Os óleos voláteis desempenharam propriedades biológicas. Aqueles que foram obtidos no período chuvoso tiveram maior atividade antioxidante (método ORAC) e maior percentual de sesquiterpenos oxigenados, o que está de acordo com a literatura.

Todos os óleos voláteis da *P. myrtoïdes* testados no presente trabalho mostraram atividade antibacteriana entre moderada e fraca, frente às bactérias aeróbias e anaeróbias bucais testadas. Os padrões trans-carofileno e óxido de carofileno apresentaram também baixa atividade frente às bactérias aeróbias e anaeróbias bucais.

Os melhores desempenhos de atividade antifúngica foi contra a *Candida glabrata*, com CIM de 46,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo volátil obtido da folha seca do período seco (setembro), apresentando inibição fúngica forte, de acordo com a classificação na literatura. Com exceção do óleo volátil obtido das folhas frescas, no período chuvoso, testado contra a *Candida tropicalis* (CIM de 375 $\mu\text{g mL}^{-1}$), todos os outros resultados mostraram atividade entre fraca à moderada. Seguindo o mesmo critério de inibição, todos os óleos voláteis apresentaram atividade fraca contra o fungo *Candida albicans*. Os padrões da Sigma-Aldrich testados trans-carofileno e óxido de carofileno apresentaram moderada atividade frente aos fungos *Candida glabrata* (750 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Candida tropicalis* (750 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Para a atividade antiprotozoária, apenas o óleo volátil obtido da folha seca, no período seco, teve atividade contra *Trypanosoma cruzi*, com o IC_{50} de 54,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apenas os óleos voláteis obtidos no período com chuva apresentaram atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*, tendo o óleo volátil da folha fresca o IC_{50} de 31,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o óleo volátil da folha seca o IC_{50} de 55,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Pelo cálculo de índice de seletividade, constatou-se maior seletividade pelo *Trypanosoma cruzi* IC_{50} (54,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do que toxicidade para as células Vero CC_{50} (71,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para o óleo volátil testado a partir da folha seca no período seco. Pelo cálculo de índice de seletividade constatou-se maior seletividade pela *Leishmania amazonensis* (IC_{50} 31,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 55,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do que

toxicidade para as células Vero CC_{50} ($53,79 \mu\text{g mL}^{-1}$; $66,57 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente, para o óleo volátil obtido da folha fresca e óleo volátil obtido da folha seca, no período chuvoso.

Para a atividade enzimática da α -amilase, todos os óleos voláteis apresentaram baixos percentuais de inibição. Para atividade enzimática da α -glicosidase, não houve inibição para os óleos voláteis obtidos no período seco, e houve baixa inibição para os óleos voláteis obtidos no período com chuva. Para atividade enzimática da lipase pancreática, todos os óleos voláteis testados apresentaram baixa inibição.

Os resultados de *docking* molecular (*in silico*) para as enzimas α -amilase e lipase demonstraram que os principais compostos dos óleos voláteis são candidatos a inibir estas enzimas, bem como os padrões utilizados. Entretanto, os resultados *in vitro* (IC_{50}) da enzima alfa-amilase salivar humana com o óxido de cariofileno e trans-cariofileno não apresentaram inibição, isto é, não houve correspondência entre o teste *in silico* e o teste *in vitro*. A causa para não ter acontecido a inibição enzimática *in vitro* pode ser as poucas interações intermoleculares, o que faz com que não haja formação do complexo ligante-enzima.

Os resultados *in vitro* (IC_{50}) da lipase pancreática com o óxido de cariofileno e trans-cariofileno demonstraram que o *docking* molecular é uma ferramenta que pode auxiliar e prever o comportamento dos compostos químicos no sítio ativo da enzima. Portanto, houve correspondência do teste *in vitro* com o teste *in silico*, indicando que os ligantes podem ser novos candidatos a fármacos para serem estudados no combate a obesidade.

Conclui-se que, os resultados evidenciam promissoras perspectivas com o estudo do óleo volátil obtido da planta *Psidium myrtoides* O. Berg, comprovando atividades antifúngicas, antioxidantes e anti-leishmanicidas relevantes a partir dos testes biológicos realizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, Robert. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. 4. ed. Allured Pub Corp, 2007. 804 p.

ÁLVAREZ-CARRETERO, S. S. et al. VSpine, an integrated resource for virtual screening and hit selection: applications to protein tyrosine phosphatase inhibition. **Molecules**. v. 23, n. 2, p. 1–14, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020353>

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

AMIN, H. M. et al. Anti-obesity potential of orlistat and amphetamine in rats fed on high fat diet. **Middle east journal of applied sciences**. v. 5, n. 2, p. 453–461, 2015. Disponível em: <<http://www.curreweb.com/mejas/mejas/2015/453-461.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 61, n. 46, p. 10835–10847, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf403496k>

ARGOLO, A. M. et al. **Doença de chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro, 2008.

BASAK, S. S.; CANDAN, F. Chemical composition and in vitro antioxidant and antidiabetic activities of *Eucalyptus Camaldulensis* Dehnh. essential oil. **Journal of the Iranian Chemical Society**. v. 7, n. 1, p. 216–226, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03245882>

BEARDSSELL, D. V. et al. Reproductive biology of australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**. v. 41, n. 4–5, p. 511–526, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT9930511>

BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of camphene, zerbene and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 148, p. 781–786, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.044>

BHAGAVAN, N. V.; HA, C.-E. Lipids II: Phospholipids, Glycosphingolipids, and Cholesterol. **Essentials of Medical Biochemistry**. 2.ed. Academic Press, 2015. 299-320 p.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**. v. 12, n. 19–20, p. 879–889, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.024>

BLANCO, V.R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017. DOI: <dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170055>

BOTREL, P.P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl. Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 32, n. 3, p. 533–538, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3415>

BREITMAIER, E. **Terpenes—flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006, 214 p.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**. v. 27, n. 4, p. 902–908, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n4/35.pdf>>.

BROWN, S.K.; GARVER, W.S., ORLANDO, R.A. 1,8-cineole: an underappreciated anti-inflammatory therapeutic. **Journal of Biomolecular Research & Therapeutics**. v.6, n.1, 2017. DOI: [10.4172/2167-7956.1000154](https://doi.org/10.4172/2167-7956.1000154)

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**. v. 4, n. 165, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>

CANDAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 87, p. 215–220, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00149-1)

CAREY, J. C; BAMSHAD, M. J.; JORE, L. B. **Genética Médica**. 5. ed. Elsevier Health Education. 368 p.

CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 4, p. 600–606, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400021>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

CASCAES, M. M. et al. Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): a review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal Molecular Sciences**. v.16, p. 23881–23904, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161023881>

CASE, R. J. et al. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.005>

CASTRO, P. R. C.; BERGEMANN, E. C.. Efeitos de giberelinas na morfologia produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Carioca'. In: ANAIS ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ. 1973. XXX. ed. **Anais...**São Paulo.

CHALANNAVAR, R. K.; NARAYANASWAMY, V. K.; BAIJNATH, H.; ODHAV, B. Chemical composition of essential oil of *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (Myrtaceae). **African Journal of Biotechnology**. v. 11 n.33, p. 8341-8347, 2012. DOI: [10.5897/AJB10.1942](https://doi.org/10.5897/AJB10.1942)

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B.. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**. v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016>

COOGAN, M.M; GREENSPAN, J. ; CHALLACOMBE, S. J. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 83, n. 9, p. 700–706, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/S0042-96862005000900016>

COSTA, I. R. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando Psidium e gêneros relacionados**. São Paulo, 2009. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

COURA, J. R. et al. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica, da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30, n. 2, p. 139–144, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821997000200009>

CREVELIN, E. J. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p. 9–11, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102317>

DA SILVA SANTOS, T. V. et al. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering**. v. 32, n. 3, p. 530–535, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>

DA SILVA, V. P. et al. Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products**. v. 123, p. 638–645, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.033>

DA SILVA, J.D. et al. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium spp.* **Flavour And Fragrance Journal**. v. 18, n. 3, p. 240–243, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1219>

DE ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 83, p. 1-7, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000702014>

DE GOUVEIA, N. M. et al. An *in vitro* and *in vivo* study of the α -Amylase activity of Phaseolamin. **Journal of Medicinal Food**. v. 17, n. 8, p.915-920,2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2013.0044>

DE MEDEIROS, F. C. M. et al. Scents from Brazilian Cerrado: *Psidium myrsinites* DC. (Myrtaceae) leaves and inflorescences essential oil. **Journal of Essential Oil Research**. v. 27, n. 4, p. 289–292, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2015.1037020>.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; SEZEZERBOWSKI, D. Quinina: 470 Anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600042>

DE SOUZA, L. I. O. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.96, p. 1055-1064, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121>

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2.ed. Ottawa: John Wiley & sons, 2002.507 p.

DIAS, A. L. B. et al. Chemical composition and in vitro antibacterial and antiproliferative activities of the essential oil from the leaves of *Psidium myrtoides* O. Berg (Myrtaceae). **Natural Product Research**. v. 6419, p. 1-5, 2018.

DIEKEMA, D. J. et al. Epidemiology of candidemia: 3-Year results from the emerging infections and the epidemiology of iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 4, p. 1298-1302, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1298-1302.2002>

DUCROQUET, J.P.H.J.; HICKEL, E. R. Birds as pollinators of feijoa (*Acca sellowiana* Berg). **Acta horticulturae**. v. 452, p. 37-40, 1997. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.452.5>

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. v.21, n. 4, p. 308-323, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>

ESSOILDB: A database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. 2014-2019. citado 2019 mar. 20]. DOI: <https://doi.org/10.1093/database/bau120>

FALCI, D.R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and Biomedical Research**. v. 35, p. 65-82, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4322/2357-9730.56021>

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M. et al. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 118, p. 322-327, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.042>

FONTES, A.P.S. et al. Química de substâncias Bioativas: obtenção, planejamento, e análise. 1. ed. UFJF, 2017. 296 p.

FRAZON, R. C. et al. Araças do gênero psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Embrapa Cerrados - Documentos (INFOTECA-E), 2010. 48 p.

FREITAS, M. O.; ORAIS, S. M.; SILVEIRA, E. R. Volatile Constituents of *Psidium myrsinoides* O. Berg. **Journal of Essential Oil Research**. v.14, n.5, p.364-365, 2002. DOI:<https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699885>

FUNKE, I.; MELZIG, M. F. Plantas tradicionalmente utilizadas na terapia da diabetes: fitomedicamentos como inibidores da atividade α -amilase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 1, p. 1-5, 2006.

FURLANETO, M.C. et al. Distribuição de espécies e suscetibilidade in vitro ao fluconazol de isolados clínicos de *Candida* em um hospital terciário brasileiro num período de três anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 5, p. 595-599, 2011.

FURTADO, F. et al. Seasonal variation of the chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of the essential oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Molecules**. v.

19, n. 12, p. 4560-4577, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules19044560>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GU, D. et al. Chemical composition and α -amylase inhibitory activity of the essential oil from *Sabina chinensis* cv . Kaizuca leaves. **Natural Product Research**. v.32, n.6, p.711-713, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332612>

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**. v. 311, n. 1, p. 98-99, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00379-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00379-2)

H.-T, C. et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 14, p. 6266-6270, 2008. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.005>

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**. v.73, n.9, p. 919-934, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm201451h>

JARADAT, N. et al. Anti-Lipase potential of the organic and aqueous extracts of ten traditional edible and medicinal plants in Palestine: a comparison study with orlistat.. **Medicines**. v. 4, n. 89, p. 1–13, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/medicines4040089>

JOY, S. et al. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. v. 6, n. 6, p. 601–5, 2006. **In Silico Biology**.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; FOLEY, W. J. Molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**. v. 56, n. 3, p. 197–213, 2008. DOI:<http://dx.doi.org/10.1071/BT07146>

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1021/jm201451h>

JARADAT, N. et al. Anti-Lipase potential of the organic and aqueous extracts of ten traditional edible and medicinal plants in Palestine: a comparison study with orlistat. **Medicines**. v. 4, n. 89, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines4040089>

JOY, S. et al. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. v. 6, n. 6, p. 601-5, 2006. In *Silico Biology*.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; FOLEY, W. J. Molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**. v. 56, n. 3, p. 197-213, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT07146>

KIM, E.; PARK, II-K. Fumigant antifungal activity of myrtaceae essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three aspergillus species. **Molecules**. v. 17, n. 9, p. 10459-10469, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules170910459>

KLOCKGETHER-RADKE, A. P. Klockgether-Radke. F. W. Sertürner und die entdeckung des morphins. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. v. 37, n. 5, p. 244-249, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2002-30132>

LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M. L. The genera of myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**. v. 49, n. 4, p. 508, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2307/2807742>

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour And Fragrance Journal**. v. 27, p. 13-39, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.2082>

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, M. A.; NASCIMENTO E. A.; MORAIS, S. A. L.; NELSON, D. L. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol. 20, n. 1, p. 41-44, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100009>

LOURA, L. G. **Variação sazonal, horário de coleta e potencial antimicrobiano do óleo essencial de Cinnamodendron dinisii Swacke**. Lavras. 64p. Dissertação (mestrado acadêmico) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 2015.

MACEDO-COSTA, M. R. et al. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 2, p. 565-571, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400010>

MACHADO, K. E. et al. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**. v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880200500303817>

MARTINS, C. M. et al. Chemical constituents and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc Essential Oils. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/842047>

MARTINS, Mário M. et al. Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliiana* (Less) Druce (Asteraceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**. v. 18, n. 3, p. 561-569, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895683>

MENDES, Luiza Alves et al. Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops and Products**. v. 108, p. 684-689, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.034>

MENG, X-Y et al. Molecular Docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**. v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

MESQUITA, S. S; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVUL, E. F. C. Carotenoides: propriedades, aplicações e mercado. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170040>

MIKULSKA, M. et al. Occurrence, presentation and treatment of candidemia. **Journal Expert Review of Clinical Immunology**. v. 8, n. 8, p. 755-765, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1586/eci.12.52>

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases - an overview. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, p. 163-173, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.002>

NASCIMENTO, A. M. A. et al. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. v.92, n.1, p. 95-100, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9139-x>

NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. **Phytochemistry Reviews**. v. 14, n. 4, p. 675-690, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9369-x>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014.

Journal of Natural Products. v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

OLIVEIRA, E. F. et al. Leaf morphology and venation of *psidium* species from the Brazilian savanna. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 27, n. 4, p. 407-413, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.03.005>

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (Copaifera spp.) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognesia.** v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>

PAHO. Organização Pan-Americana da Saúde. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5666:folha-informativa-hiv-aids&Itemid=812>. Acesso em: 24 mar. 2019.

PAN, Zheng et al. Caryophyllene oxide exhibits anti-cancer effects in MG-63 human osteosarcoma cells via the inhibition of cell migration, generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. **Bangladesh Journal of Pharmacology.** v. 11, n. 4, p. 817, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i4.27517>

PARK, Kyung Ran et al. β -caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters.** v. 312, n. 2, p. 178-188, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.001>

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.** v. 1696, n. 2, p. 171-180, 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.10.012>

PEREIRA, A. O. et al. Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. **Industrial Crops and Products.** v. 121, p. 461-467, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.052>

PIERRI, C. L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Biochimica et biophysica acta computational approaches for protein function prediction: a combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.** v. 1804, n. 9, p. 1695-1712, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.008>

PILLAY, P. et al. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their

utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**. v.68, n.8, p.1200-1205, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.019>

PIMENTEL, F. A. et al. Influência da secagem sobre o rendimento e composição química dos compostos voláteis das raízes de *Piper piscatorum* trel. & yunck. (Piperaceae). **Química Nova**. v. 35, n. 4, p. 715-718, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000400011>

PINO, J. A. et al. Essential oil of *Mitranthes ottonis* Berg from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**. v. 11, n. 6, p. 703-704, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9712000>

PINTO, J.C.P. et al. II Consenso brasileiro em doença de chagas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 25, n. 21, p. 7-86, 2016.

PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**. v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000900021>

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**. v. 18, p. 797-810, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

PROTEIN DATA BANK. CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN GASTRIC LIPASE. 2019. Disponível em: <http://www.rcsb.org/structure/1HLG>

PROTEIN DATA BANK. Role of mobile loop in the mechanism of human salivary amylase. 2019. Disponível em: <http://www.rcsb.org/structure/1JXJ>

RAMASUBBU, N. et al. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å Resolution: implications for its role in the oral cavity. **Acta Crystallographica**. v. D52, p. 435-446, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0907444995014119>

REFLORA. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2018. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

REZENDE, C. M. et al. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Química Nova**. v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300010>

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>

ROLÓN, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>

ROMAGNOLO, M. B.; DE SOUZA, M. C. O. Gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na

planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000300004>

ROTTINI, M. M. et al. Experimental parasitology in vitro evaluation of (-) α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes without treatment. **Experimental Parasitology**. v. 148, p. 66-72, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.10.001>

SAHAND, I. H. et al. Supplementation of CHROMagar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 11, p. 5768-5770, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5768-5770.2005>

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 120, n. 2, p. 204-208, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.007>

SANTOS, T. G. et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**. v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000300007>

SARTORATTO, A. et al. Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas usadas no Brasil. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SHAN, X. et al. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 82, p.249255,2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036>

SIBANDA, S. et al. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *heteropyxis dehniae* from zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 92, n. 1, p. 107-111, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.010>

SIENIAWSKA, E. et al. The effect of combining natural terpenes and antituberculous agents against reference and clinical mycobacterium tuberculosis strains. **Molecules**. v. 23, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23010176>

SIKKEMA, J. et al. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological reviews**. v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995. Acesso em: 25 mar. 2019

SILVA, E. A. J. et al. Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of *guava*. **Ciência Rural**. v. 46, n. 10, p. 1771-1776, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150947>

SILVA, H. C. G. **Triagem virtual de compostos provenientes de plantas da biodiversidade brasileira, com potencial atividade inibitória das enzimas alfa-amilase, alfa-glicosidase humanas**. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A. PETROVICK. P. R. (Orgs). **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Artmed editora Ltda, 2017. 486 p.

SOARES, D. C. et al. Trans-Caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera spp.*) v. 2013, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/761323>

SOARES-SILVA, L. H.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 158, p. 775-777, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00921.x>

SOBRINHO, J. L. S. et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas. **Journal of Tropical Pathology**. v. 36, n. 24, p. 103-118, 2006. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v36i2.1783>

TABER, D. F.; NEUBERT, T. D.; RHEINGOLD, A. L. Synthesis of (-)-Morphine. **Journal American Chemistry Society**. v. 124, n. 42, p. 12416-12417, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja027882h>

TANGUENYONGWATANA, P.; JONGKON, N. Molecular docking study of tyrosinase inhibitors using ArgusLab 4.0.1: a comparative study. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, n. 1, p. 21-25, 2016.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015. 2015. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/summary/>>.

THOMPSON MA. Molecular docking using ArgusLab, an efficient shape-based search algorithm and the AScoring function, 2004. Disponível em: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>.

TOMA, A. et al. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, p. 1-5, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.12, n. 1, p.40-53, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>

VASCONCELOS, T. N. C. et al. Systematic and evolutionary implications of stamen position in Myrteae (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 179, n. 3, p. 388-402, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/boj.12328>

VIJAYALAXMI, A. et al Anti-Arthritic and anti inflammatory activity of beta caryophyllene against freund's complete adjuvant induced arthritis in wistar rats. **Journal of Bone Reports & Recommendations**. v.1 n. 2:9, 2015.

WANG, Z. et al. Design, synthesis and docking study of 5-(substituted benzylidene) thiazolidine-2,4-dione derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, n. 15, p. 3337-3340, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.099>

WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Digestive diseases and sciences**. v. 52, n. 1, p. 1-17, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>

WILSON, P. G. et al. Myrtaceae Revisited: A reassessment of infrafamilial Groups. v. 88, n. 11, p. 2013–2025, 2015. DOI: [10.2307/3558428](https://doi.org/10.2307/3558428).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis, 2015)**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 25 dez. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Distribution of cases of Trypanosoma cruzi infection, based on official estimates and status of vector transmission**, 2010. 2018. Acesso em: 25 dez. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Países com casos de leishmaniose visceral, 2016**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 25 dez. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Leishmaniases: timeline of facts**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/disease/Leishmaniasis-interactive-timelines/en/>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Diabetes Day 2018**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/diabetes/world-diabetes-day-2018/en/>

XING, M. et al. Antifungal activity of natural volatile organic compounds against litchi downy blight pathogen peronophythora litchii. **Molecules**. v. 23, n. 2, p. 1–15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020358>

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v. 10, n. 1, p. 95–105, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2147/TCRM.S40160>

YIN, Z. et al. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**. v. 3, n. 3–4, p. 136–174, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003> Acesso em: 25 dez. 2018

APÊNDICE A - Lista de trabalhos gerados a partir de resultados descritos na dissertação

DIAS, R. F. C.; AQUINO, F. J. T.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CUNHA, L. C. S.; MARTINS, C. H. G.; AMBROSIO, M. A. L. V.; SOUZA, J. M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil *Psidium myrtoides* O. Berg. In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2018, Foz do Iguaçu-PR. 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- Livro de Resumos. São Paulo: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ, 2018.

DIAS, R. F. C.; AQUINO, F. J. T.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, A.; SILVA, C. V.; COSTA, M. S.; ESPINDOLA, F. S.; JUSTINO, A. B. Antiprotozoal, cytotoxic and antioxidant activities of *P. myrtoides* O. Berg. 2018. (Apresentação de Trabalho/ XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química- ERSBQ, 2018).

DIAS, R. F. C.; RODRIGUES, T. S.; SILVA, C. R.; AQUINO, F. J. T.; De Oliveira, Alberto; BARBOSA, F. H.; DIAS, F. M. F.; DANTZGER, D. R. C. Modulatory effect of the essential oil of *Psidium myrtoides* O. Berg (Araçá-roxo) on the inflammation in the *Drosophila melanogaster* eyes. **42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019**, Joinville-SC. 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- Livro de Resumos. São Paulo: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ, 2019.

AQUINO, F. J. T.; **DIAS, RFC;** CUNHA, LCS; MORAIS, SAL; OLIVEIRA, A; AMBROSIO, MALV; MARTINS, CHG; SOUZA, JM. Chemical Composition and antibacterial and antifungal activities from leaves essential oil of *Psidium myrtoides* O. Berg. **42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019**, Joinville-SC. 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- Livro de Resumos. São Paulo: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ, 2019.

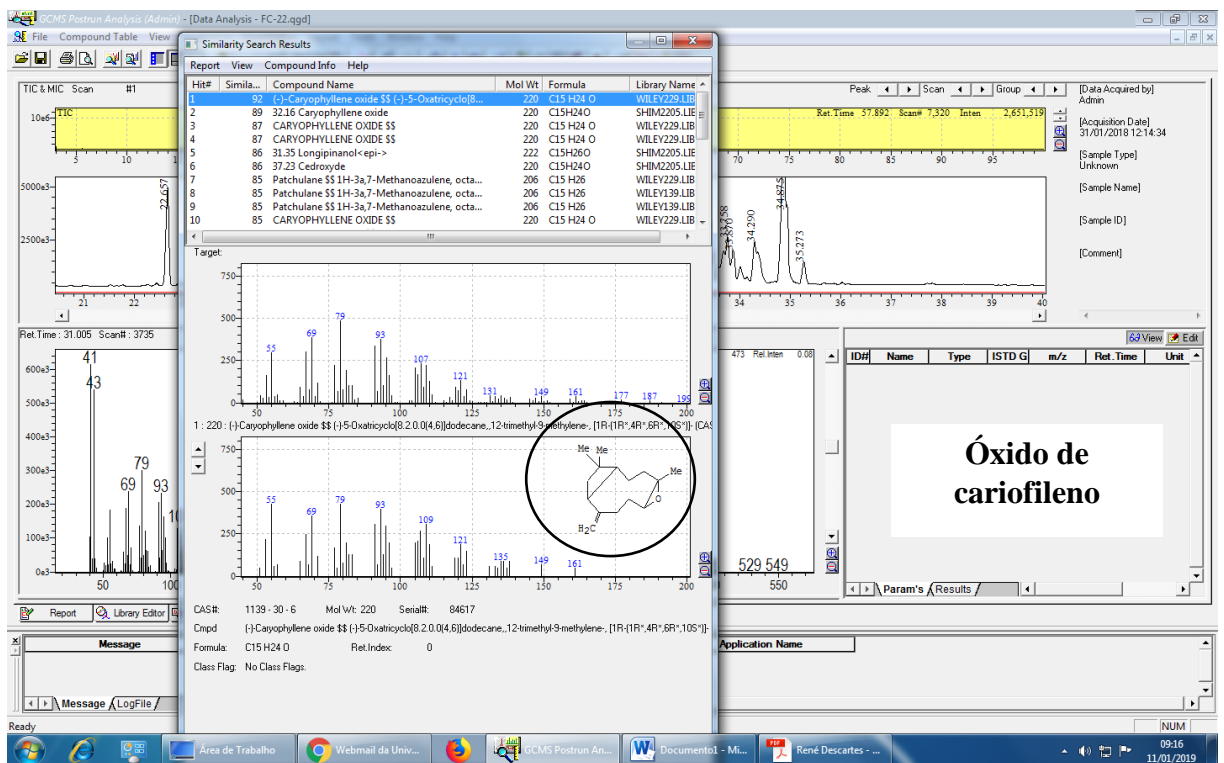
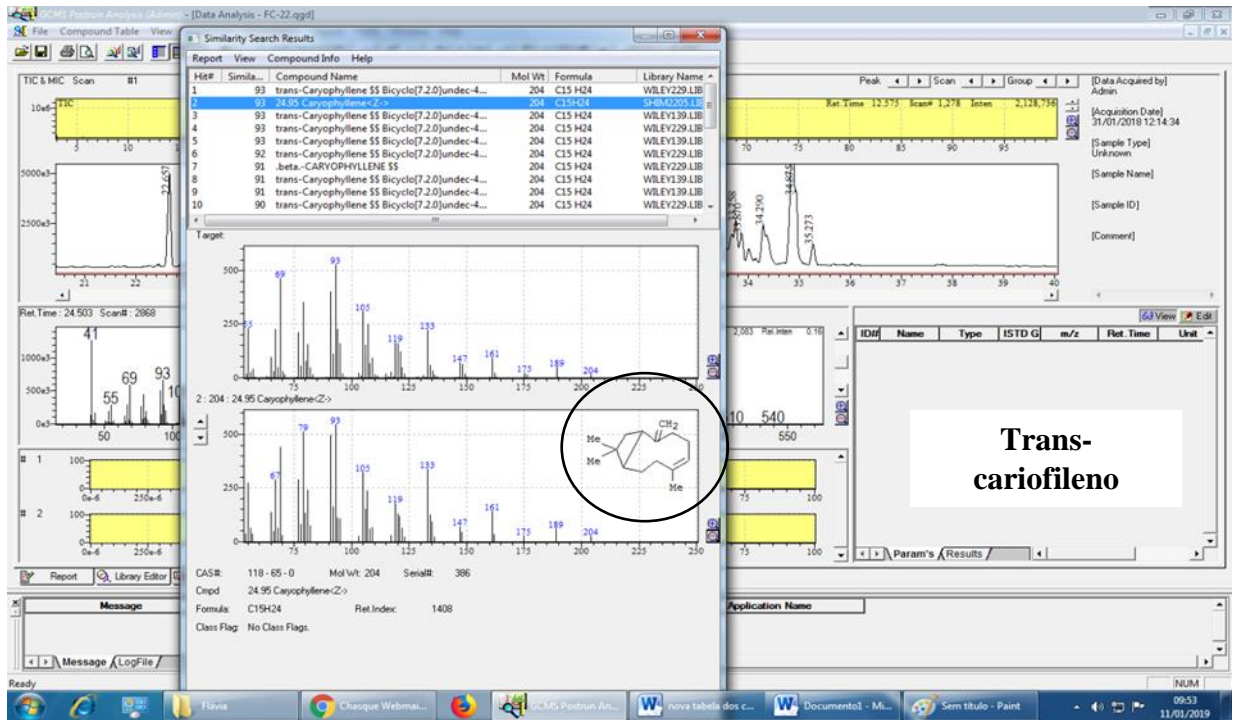
Outros trabalhos de co-autoria com participação em congresso relacionados ao tema do estudo:

DANTZGER, D. R. C.; **DIAS, R. F. C.;** DIAS, F. M. F.; FARIAS, R. R. *Inibição enzimática da alfa amilase e lipase humana por docking molecular*. Reunião Regional da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2019, Sobral- CE. (Apresentação de Trabalho/ Reunião Regional da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência- SBPC, 2019).

APÊNDICE B- Identificação dos componentes do óleo volátil

Os constituintes químicos do óleo volátil da *P. myrtoides* foram caracterizados qualitativamente por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A identificação dos constituintes químicos foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos do experimento com os espectros de massas disponíveis no banco de dados do equipamento (Biblioteca Adams), conforme está demonstrado no exemplo com a figura 1 com as moléculas de trans-cariofileno e óxido de cariofileno. A identificação também foi realizada através do índice aritmético (IA) com relação à série de alcanos C₈-C₃₀ (Adams, 2007). A tabela 1 demonstrada, serve para determinar o índice aritmético (IA).

Figura 1- Comparação entre o espectro de massas obtido através do experimento e o espectro de massas teórico da biblioteca (método Adams)



Nesta equação são considerados os tempos de retenção do alcano anterior ($Tr(Pz)$) e posterior ($Tr(Pz + 1)$) ao tempo de retenção dos compostos analisados ($Tr(x)$) e o número de carbono do alcano ($C(Pz)$) com tempo de retenção anterior ao analisado. A tabela 1 mostra o tempo de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético (IA).

Tabela 1-Tempos de retenção dos alcanos utilizados para o cálculo do índice aritmético na análise por CG-MS

Número de carbonos	Tempo de retenção (min)	Número de carbonos	Tempo de retenção (min)
C10	7,35	C20	42,15
C11	11,22	C21	45,45
C12	15,08	C22	48,48
C14	19,34	C23	51,50
C15	23,59	C24	54,29
C16	27,58	C25	57,07
C17	31,57	C26	59,66
C18	35,21	C27	62,24
C19	38,84	C28	65,44
		C29	
		C30	

O IA foi calculado através da equação 1, utilizando o tempo do composto analisado e dos padrões de alcanos (C₈-C₃₀) previamente injetados utilizando a mesma metodologia.

$$IA(x) = 100C(pz) + 100 \left[\left(\frac{Tr(x) - Tr(pz)}{Tr(pz+1) - Tr(pz)} \right) \right] \text{ Equação 1}$$

Onde:

IA= Índice aritmético;

Tempo do alcano anterior (**Tr(Pz)**) = Tempo de retenção do alcano de menor cadeia;

Tempo do alcano posterior (**Tr (Pz +1)**) = Tempo de retenção do alcano de maior cadeia;

Tempo do composto analisado (**Tr(x)**) = Tempo de retenção do composto a ser identificado;

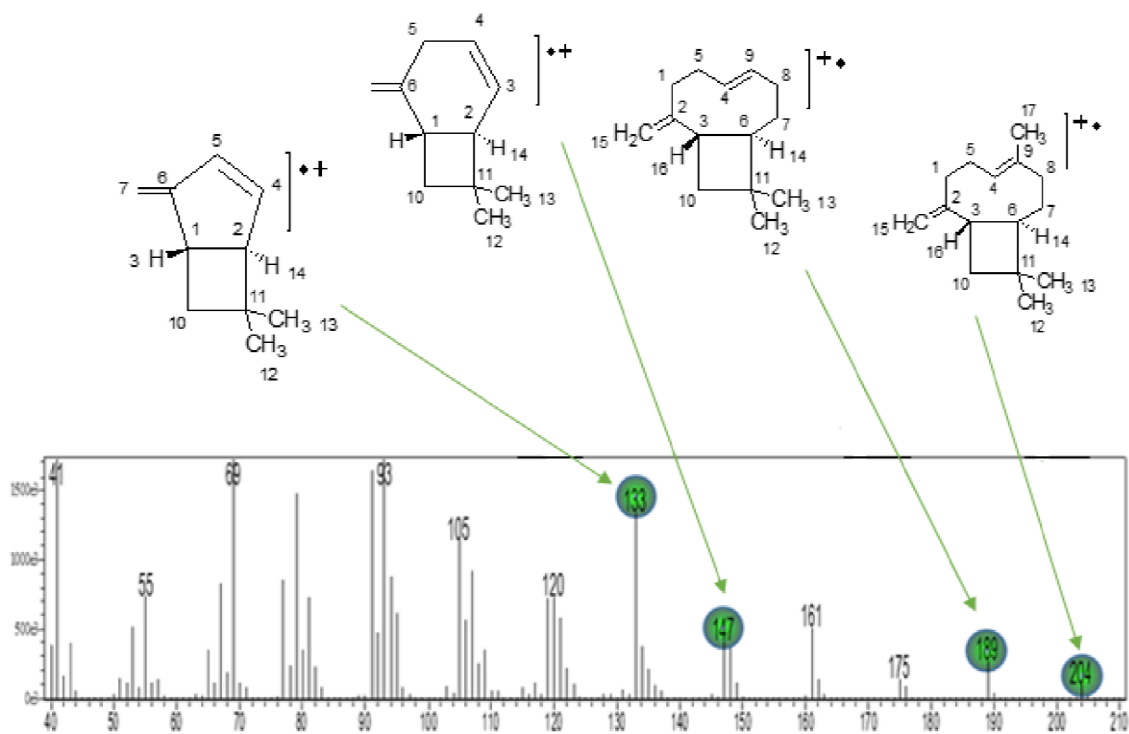
Número de carbono do alcano (**C(Pz)**) = Número de carbono do alcano com tempo de retenção anterior ao identificado.

O IA calculado é comparado com o de compostos isolados tabelados por Adams (2007). Além disso, o IA calculado, também foi comparado com o NIST (2014), nas mesmas condições utilizadas para a análise em CG-EM.

A figura 2 mostra o espectro de massas do trans-cariofileno e uma proposta parcial de fragmentação. O espectro de massa do trans-cariofileno com a uma similaridade obtida de

93% pelo banco de dados da biblioteca Adams, apresentou um pico de íon molecular com m/z 204 $[M]^+$, um pico com m/z 189 $[M^+-CH_3]$, devido à eliminação do grupo metila (**C17**) formando um carbocátion secundário. Partindo destes, novas fragmentações são observadas, com um sinal de $m/z = 147$, eliminando uma molécula neutra, possivelmente, o propano (C_3H_6 de $M = 42g/mol$), e o fragmento com $m/z = 133$, originado possivelmente por eliminação de um fragmento neutro, de isobutileno (C_4H_8 , $M = 56g/mol$).

Figura 2 - Espectro de massas do trans-cariofileno (sesquiterpeno hidrocarboneto) e proposta estrutural para alguns fragmentos



Fonte: A autora (2019).

A Figura 3 apresenta o espectro de massa do óxido de cariofileno e descreve uma proposição estrutural para os fragmentos gerados nas clivagens iniciais. O espectro de massa do óxido de cariofileno com a uma similaridade obtida de 92% (Figura 1) pelo banco de dados da biblioteca Adams, apresentou um pico de íon molecular com m/z 220 $[M]^+$ correspondendo a fórmula $C_{15}H_{24}O$. A formação do fragmento com $m/z = 205 [M^+-CH_3]$ deveu-se à perda da metila ligada ao carbono **C6** (na posição β ao heteroátomo), formando um

carbocátion secundário. Partindo do íon/radical $m/z = 205$, outra possível fragmentação pode ocorrer com a clivagem do ciclo butano com eliminação do isobutileno (neutro) de $M = 56\text{g/mol}$ com formação do íon/radical de $m/z = 149$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}^+$).

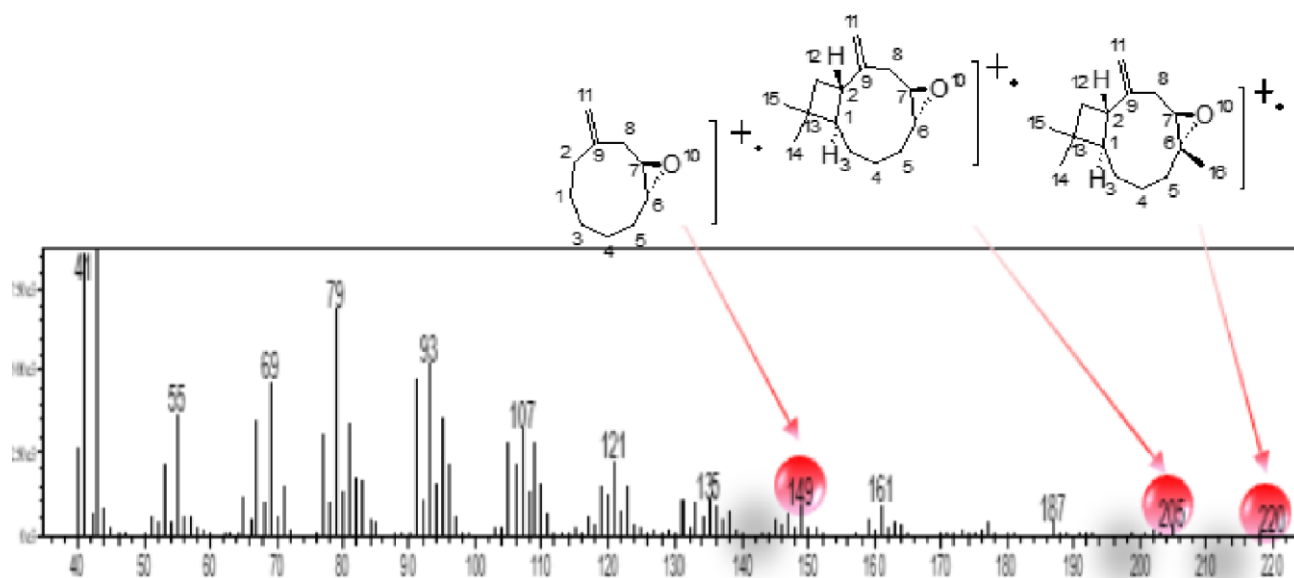


Figura 3- Espectro de massas do óxido de cariofileno (sesquiterpeno oxigenado) e proposta estrutural para alguns fragmentos.

Fonte: A autora (2019).