

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação do efeito protetor de Óleos Essenciais extraídos
de *Eugenia brejoensis* *Croton sp.* contra a morte celular
induzida pelo estresse oxidativo.

CLOVIS MACÊDO BEZERRA FILHO

ORIENTADORA:

MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIRA

CO-ORIENTADORA:

MARCIA VANUSA DA SILVA

Recife, 2014

CLOVIS MACÊDO BEZERRA FILHO

**Avaliação do efeito protetor de Óleos Essenciais extraídos
de *Eugenia brejoensis* *Croton* sp. contra a morte celular
induzida pelo estresse oxidativo.**

Dissertação apresentado como um dos
requisitos para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Maria Tereza dos Santos
Correia

Coorientador: Márcia Vanusa da Silva

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Bezerra Filho, Clovis Macêdo

Avaliação do efeito protetor de óleos essenciais extraídos de *Eugenia brejoensis* e *Croton* sp. contra a morte celular induzida pelo estresse oxidativo / Clovis Macêdo Bezerra Filho- Recife: O Autor, 2014.

79 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui referências, apêndices e anexos

- 1. Plantas medicinais 2. Essências e óleos essenciais 3. Sêmen I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Silva, Márcia Vanusa (coorientadora) III. Título**

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-120

Clovis Macêdo Bezerra Filho

“Avaliação do efeito protetor de óleos essenciais extraídos de *Eugenia brejoensis* e *Croton*
sp. contra a morte celular induzida pelo estresse oxidativo”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Presidente

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Profa. Dra. Andreia Ferandes de Souza

Dr. Luis Cláudio Nascimento da Silva

Data: 10/02/2014

Dedico este trabalho aos meus pais,
amigos e mestres que juntos me ajudaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me concede a graça dos dias, a compreensão de cada fato e a vontade de persistir eternamente transformando meu íntimo a caminho da luz espiritual. À minha família na figura do meu pai *in memoriam* e a minha mãe, meu farol e alento em todos os momentos, a tradução mais perfeita do que é o amor incondicional. Aos meus mestres professores que sabem despertar diariamente meu amor e devoção pela ciência, especialmente às orientadoras Tereza Correia e Márcia Vanusa que sempre confiaram no meu trabalho com carinho e respeito e me inspiram na postura profissional que apresentam como figuras humanas, que ajudam a mudar esse país por meio do conhecimento, na difícil realidade da universidade pública brasileira. Aos amigos do grupo de pesquisa, cuja caminhada diária transformou os debates sobre nossos projetos científicos em companheirismo que deixa o trabalho e convivência ainda mais satisfatórios. Túlio, Carol (meus conselheiros), Clébia, Cibele, Conceição, Daniel (Bob), Ana Paula, Ana Cláudia, Bruna, Tayanne, Ana Célia, Júnior, Sivoneide, Evelyn e todos os demais, tudo certamente seria bem mais difícil sem a contribuição de vocês! Aos meus amigos queridos do quarteto que mesmo nas distâncias necessárias às nossas vidas profissionais sempre estão presentes, ajudando, rindo e preocupados uns com os outros (nos congressos, viagens e família), Raiana (minha doce esposa que com seu cuidado sempre fez o que pode pra unir a gente), Mychely (um amor de pessoa, a cantora mais elegante da Bioquímica), Thiago (o cientista mais trabalhador e onipresente na minha vida que eu conheço; o melhor parceiro), amo todos vocês! Ao amigo Luís Cláudio pela parceria científica e diversão garantida durante as nossas corridas conversas assim como os aperreios. Aos alunos Júnior e Thiago pela participação fundamental neste projeto. Às minhas amigas de uma vida inteira Weruska e Jackie que mesmo em suas correrias profissionais, sempre estão em dia com nossas amizades e que fazem a vida mais bonita simplesmente por existirem. Aos amigos do centro espírita, em especial a Arcelino Ribeiro pela compreensão e estímulo para continuar fazendo o bem e a caridade àqueles que necessitam. À Marina Marshi, grande amiga em vários momentos, companheira que junto com o Thiago fazem parte do passeio ciclístico da cidade mais divertido dos Domingos e dona de uma grande sabedoria nas palavras que trocamos. Ao Departamento de Bioquímica e seus funcionários que garantem o funcionamento e sempre estão a postos para ajudar os alunos que necessitam, em especial ao técnico, Seu João, que sempre esteve ao meu lado ajudando na extração dos óleos e me passando todo o seu conhecimento. Aos meus amigos da turma de mestrado, especialmente a Jéssica Frutuoso (amiga dos tempos de IC) e a todas as pessoas queridas que conheci e fiz amizade ao longo desse tempo.

"Eu resolvi ficar com o amor,
o ódio é um fardo muito grande para carregar."
(Martin Luther King)

RESUMO

A Caatinga é um bioma extremamente rico cujas espécies vegetais apresentam promissor potencial farmacológico. Baseados no conhecimento popular, o uso de extratos e óleos essenciais obtidos pelos mais variados métodos extrativos tem motivado a pesquisa científica em busca de moléculas ou o conjunto delas com notável aplicação medicinal. A literatura demonstra que desde a antiguidade os óleos essenciais são empregados em diversas áreas da medicina e da cosmética; na área de medicamentos à base de vegetais são descritos também como fatores regulatórios da fertilidade. O presente estudo visou obter e caracterizar os óleos essenciais de três espécies da caatinga: *Eugenia brejoensis*, *Cronton sp.* e *Myroxylon peruiferum*, bem como avaliar suas ações frente a morte celular de células Vero e a motilidade de espermatozoides humanos. Adicionalmente, objetivou-se efetuar uma ampla revisão sobre o efeito citoprotetor contra H_2O_2 como um método de análise de atividade antioxidante de plantas. Os óleos foram extraídos por hidrodestilação porém apenas as espécies *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* apresentaram rendimento suficiente a serem analisados em GC/MS, para tal utilizou-se colunas DB-5 de sílica, cujos resultados foram expressos em porcentagem. Amostras de sêmen foram coletadas de 12 indivíduos voluntários férteis do sexo masculino, com idades entre 18 e 45 anos, após um período de abstinência sexual de 48 a 120 h. A ação espermostática dos óleos foi testada em microplacas, utilizando diferentes concentrações dos mesmos (25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$). Os experimentos foram efetuados, em triplicata, com seis ensaios independentes e, para cada concentração foram avaliados os intervalos de 5, 15 e 30 min. O óleo essencial de *Eugenia brejoensis* apresentou em sua constituição δ -cadinene (15,33%), β -cariofileno (11,30%), biciclogermacreno (10,38%), α -muurolol (8,43%) e α -cadinol (8,12%), enquanto o óleo de *Myroxylon peruiferum* apresentou espatulenol (16,44%), α -pineno (9,82%), γ -muuroleno (7,13%) e óxido de cariofileno (6,59%), como compostos majoritários, respectivamente. Ambas as plantas exibiram ação espermostática de maneira dose-dependente. Os melhores resultados foram obtidos para o óleo de *Eugenia Brejoensis* em todos os tempos de tratamento apresentando IC_{50} de 28,99 $\mu\text{g/mL}$ (5 min), 35,19 $\mu\text{g/mL}$ (15 min) e 14,79 $\mu\text{g/mL}$ (30 min), entretanto o óleo de *Myroxylon peruiferum* também mostrou um potencial imobilizante significativo com IC_{50} 42,92 $\mu\text{g/mL}$ (5 min), 46,32 $\mu\text{g/mL}$ (15 min) e 41,69 $\mu\text{g/mL}$ (30 min). Este estudo demonstrou pela primeira vez que os óleos essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* apresentam propriedade espermostática potencial sobre os espermatozoides humanos. Em seguida, efetuou-se ampla revisão de literatura na qual também observou-se que os óleos essenciais e extratos de plantas apresentam-se como excelentes fontes de moléculas antioxidantes, com extensa aplicação em modelos biológicos *in vitro* para o combate ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 . Outros trabalhos visando caracterizar os mecanismos de ação dos óleos de *E. brejoensis* e *M. peruyferum*, bem como sinergismo de seus compostos majoritários serão alvos de futuras pesquisas do nosso grupo.

Palavras-chave: Atividade Espermicida, óleo essencial, caatinga, efeito protetor espermatozóides humanos.

ABSTRACT

Caatinga is an extremely rich biome whose species exhibit promising pharmacological potential. Based on the popular knowledge, the use of essential oils and extracts obtained by various methods extractives has motivated scientific research to molecules or set them with remarkable medicinal application. The literature shows that since antiquity essential oils are used in various areas of medicine and cosmetics; in the area of herbal medicinal plants are also described as regulatory factors of fertility. The present study aimed at obtaining and characterizing the essential oils of three species of the caatinga: *Eugenia brejoensis*, *Cronton* sp. and *Myroxylon peruiferum* and evaluate their actions against cell death of Vero cells and human sperm motility. Additionally, the objective was to perform a comprehensive review on the cytoprotective effect against H₂O₂ as a method of analysis of antioxidant activity of plants. The oils were extracted by hydrodistillation but only species *Eugenia brejoensis* *Myroxylon peruiferum* and showed enough to be analyzed by GC / MS was used for this column DB-5 silica, and the results were expressed as percentage yield. Semen samples were collected from 12 fertile male volunteers, aged between 18 and 45 years, after a period of abstinence 48-120 h. The action of espermostática oils was tested in microplates using different concentrations of the same (25, 50, 100, 200, 400 mg / mL). The experiments were performed in triplicate and six independent experiments for each concentration intervals of 5, 15 and 30 minutes were evaluated. The essential oil of *Eugenia brejoensis* presented in its constitution δ - cadinene (15.33%), β - caryophyllene (11.30%), bicyclogermacrene (10.38%), α - muurolol (8.43%) and α - cadinol (8.12%), while the oil had *Myroxylon peruiferum* spathulenol (16.44%), α - pinene (9.82%), γ - muuroleno (7.13%) and caryophyllene oxide (6.59%) as major compounds, respectively. Both plants exhibited espermostática action in a dose- dependent manner. The best results were obtained for oil *Eugenia Brejoensis* in all treatment times having IC₅₀ of 28.99 mg / mL (5 min) 35.19 mg / mL (15 min) and 14.79 mg / mL (30 min), however oil *Myroxylon peruiferum* also showed significant potential immobilizing with IC₅₀ 42.92 mg / mL (5 min), 46.32 mg / mL (15 min) and 41.69 mg / mL (30 min). This study first demonstrated that essential oils of *Eugenia brejoensis* and *Myroxylon peruiferum* have owned espermostática potential on human spermatozoa. Then it made extensive literature review in which it was also observed that essential oils and plant extracts are presented as excellent sources of antioxidant molecules, with extensive application in biological in vitro models to combat oxidative stress caused by H₂O₂. Other studies aiming to characterize the mechanisms of action of oils and *M. E. brejoensis* peruyferum and synergism of their major compounds are targets of future research in our group.

Keywords : Spermicidal activity, essential oil, caatinga, protective effect human, spermatozoa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: *Caatinga Pernambucana (Nova Jerusalém-PE)*

FIGURA 2: *Eugenia brejoensis (folha)*

FIGURA 3: *Myroxylon peruiferum*

FIGURA 4: *Principais vias de biossíntese dos metabólitos primários e secundários.*

FIGURA 5: *Saponina triterpênica*

FIGURA 6: *Redução do radical DPPH em presença de oxidantes*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relação solventes/Metabólitos secundários extraídos

TABELA 2: *Exemplos de produtos naturais com ação protetora contra a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2 .)*

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA - Mistura de isômeros 2 ou 3-terc-butil-4-hidroxianisol,

BHT -di-terc-butil metil fenol (Butylated hydroxytoluene)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH - Radical di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium EM – Espectrometria de massas

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GC-EM/ GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

IV – Infravermelho

MMA – Ministério do Meio-ambiente

OE – Óleos essenciais

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARNA – Parque Nacional

PMACS – Plantas medicinais, aromáticas e condimentares

QPN – Química de Produtos Naturais

RMN – Ressonância magnética nuclear

UV – Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2.1.CAATINGA	16
2.2. PRODUTOS NATURAIS	18
2.2.1 PLANTAS MEDICINAIS NA CAATINGA	19
2.3. <i>Eugenia brejoensis</i> , UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA MYRTACEAE	21
2.4. <i>Myroxylon peruiferum</i> , UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA FABACEA	22
2.5. METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	24
2.5.1. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
2.5.2 Terpenos	30
2.5.3 Propriedades biológicas e farmacológicas das saponinas triterpênicas.....	31
2.5.4 Propriedades biológicas e farmacológicas dos flavanóides.....	32
2.6 CRESCIMENTO POPULACIONAL E O CONTROLE DA NATALIDADE	33
2.6.1 Métodos de Barreira	34
2.6.2 Extrato de plantas como fonte alternativa para a nova geração de contraceptivos químicos.....	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4. REFERÊNCIAS.....	37
5. ARTIGOS.....	48
5.1 ARTIGO I.....	48
6. CONCLUSÕES	67
7. ANEXOS.....	68
7.1 ARTIGO Chemical composition and larvicidal activity against <i>Aedes aegypti</i> mosquito of essential oils of <i>Eugenia brejoensis</i> Mazzini (Myrtaceae) leaves	68
8. APÊNDICES	79
Apêndice 1 – Questionário Prévio à Coleta de Sêmen.	79
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido.	80

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no tratamento de enfermidades confunde-se com a própria história da espécie humana. Ao longo do tempo, o uso de diversas espécies foi selecionando, mesmo que empiricamente, e o uso de plantas com potencial ação medicinal, toxicidade ou uso na alimentação foram incorporada ao dia-a-dia das pessoas ao longo do tempo (BRESOLIN & FILHO 2003).

O uso de vegetais é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas tradições culturais que as usam como recurso terapêutico. Mesmo diante do grande avanço na pesquisa de produtos, descobertas e síntese química de compostos com ação medicinal o uso de espécies vegetais torna-se ainda mais evidente ao longo do tempo por diversas vantagens que apresenta para o emprego de moléculas biologicamente ativas, sobretudo em nosso país. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com 55 mil espécies catalogadas. Todavia, menos de 10% dessas plantas foram avaliadas em seus aspectos biológicos e não mais que 5% em seus aspectos químicos até meados dos anos 90 (DI STASI, 1996). Das 252 drogas consideradas como básicas pela OMS (Organização Mundial de Saúde, 2009) apenas 11% são originárias exclusivamente de plantas, contudo um significativo número de drogas são obtidas a partir de precursores naturais (RATES, 2011).

A caatinga apresenta diversas espécies cuja presença de óleos essenciais tem sido relatada e investigada perante diversas ações biológicas ao longo dos anos (BARBOSA LEONARDO, V.S 2010; MOURA, 2013). O ambiente no qual o vegetal se desenvolve exerce grande influencia sobre a produção e a composição química dos óleos essenciais, sendo o sertão Pernambucano uma excelente área para estudo e descoberta de novas biomoléculas (VITTI & BRITO, 2003).

Dentre os agentes terapêuticos vegetais, os óleos essenciais constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas (COSTA et al., 2008), a Caatinga apresenta-se como um bioma promissor para o estudo destes como possíveis fontes de moléculas com atividade farmacológica devido suas condições específicas de clima, solo, localização geográfica, exposição à luz solar e temperatura. Dentre essas atividades a inibição dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo é de extrema importância biotecnológica. O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade antioxidante endógena.

As espécies reativas possuem um elétron não-pareado em sua órbita externa podendo reagir com biomoléculas (proteínas, DNA, lipídios) e contribui para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas com o envelhecimento, destacando-se câncer, aterosclerose, doenças pulmonares, inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata (SCALBERT et al., 2005). Diante do potencial biotecnológico dos óleos da Caatinga a investigação de seu efeito sobre a morte celular induzida pelo estresse oxidativo e a identificação de proteínas envolvidas, representa um passo fundamental para o uso desses como produtos para indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, que implicará em ganhos de qualidade e produtividade para o estado Pernambucano e resultará em maior competitividade no mercado nacional e internacional, com importância do ponto de vista científico, social e econômico.

Eugenia brejoensis, uma espécie endêmica do sertão de Pernambuco, pertencente à família Myrtaceae, é conhecida popularmente como cutia e de recente descrição botânica (MAZINE, 2008). *Myroxylon peruiferum* é uma espécie presente em vários estados brasileiros, inclusive no nordeste, das regiões de mata atlântica a áreas de transição da caatinga (TONELLO, 2012). Pertencente a família Fabaceae, é conhecido popularmente como bálsamo, Cabreúva e Pau vermelho, este último devido ao seu porte arbóreo e sua extensa utilização na indústria madeireira (CARVALHO, 2006). A literatura tem demonstrado que os extratos de diferentes partes desta planta apresenta atividade antimicrobiana pronunciada contra fungos como *Candida albicans*, contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Salmonella* spp (GONÇALVES et al 2011; PEREZ & SUAREZ, C 1997). Comprovou-se também atividade anti-inflamatória e expectorante, e o uso popular para problemas respiratórios e cicatrização de feridas urinárias (SCHULTES & RAFFAUF 1990; TAYLOR 1998).

Diversos medicamentos à base de vegetais são descritos na literatura em todo o mundo como fatores regulatórios da fertilidade desde os tempos antigos. Métodos anticoncepcionais são descritos pela literatura médica como alternativa para evitar uma gravidez não planejada, variando entre as diversas classes, formas de atuação e variações em efetividade. Os métodos de barreira, por exemplo, consistem no uso de substâncias ou produtos que impeçam a fecundação dos espermatozoides no óvulo estabelecendo barreiras físicas ou químicas (GÓMEZ, 2007). O objetivo deste estudo é avaliar o efeito

in vitro de óleos essenciais de plantas endêmicas da Caatinga sobre a motilidade de espermatozoides humanos, caracterizando quimicamente as substâncias extraídas por hidrodestilação para posterior correlação com a atividade proposta. Ao avaliarmos e caracterizarmos a capacidade espermicida de plantas endêmicas de nossa região indicamos materiais como fontes de subsídios contraceptivos eficazes na regulação da fertilidade, minimizando os efeitos colaterais dos que são utilizados atualmente.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1.CAATINGA

O Brasil, um país de dimensões continentais (aproximadamente 8.500.000 km²) com notória diversidade de clima, vegetação, solo, fauna e microbiota, possui uma posição de vanguarda na bioprospecção de substância bioativas, sendo o detentor do maior potencial em biodiversidade do planeta. Além disso, a sua marcante diversidade cultural, resultante de seu processo de povoamento, permitiu a exploração de seus recursos naturais, em especial as plantas, de formas bem variadas e para diversos fins medicinais (GIULIETTI et al. 2005;ALBUQUERQUE et al. 2007).

O termo “caatinga” é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (PRADO, 2003). A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, compreende uma área de aproximadamente 900.000 km², que abrange os estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, chegando a ocupar 54% da Região Nordeste e 11% das terras brasileiras (ANDRADE et al. 2010). A caatinga tem como característica o potencial hídrico reduzido no solo com acentuado período de estação seca, entre sete e dez meses, sua flora nativa apresenta então caracteres anatômicos, morfológicos e funcionais especializados para a sobrevivência destas plantas às condições adversas de clima e solo (DRUMOND et al. 2000).

Figura 1- *Caatinga Pernambucana (Nova Jerusalém-PE)*



Fonte: *acervo pessoal do autor*

Dessa forma, as plantas da caatinga possuem características singulares, sendo assim excelentes alvos para a busca de novas substâncias ativas. Adicionalmente, diante da velocidade do fenômeno de devastação da caatinga, há o risco que muito das propriedades medicinais dessas plantas não sejam reconhecidas, o que torna mais urgente intensificar os investimentos nessa área. Devido aos sistemas de produção agrícola predominantes, a vegetação atual do semiárido brasileiro é um mosaico de pequenas áreas com distintos tempos de regeneração, entremeadas a poucas áreas de caatinga madura preservada. Mesmo frente a tanta riqueza, a vegetação original de caatinga já foi alterada e fragmentada pelas atividades humanas num percentual superior a 28%. A perda destas paisagens tem consequências graves para a manutenção da biodiversidade, podem levar ao desaparecimento de espécies e organismos endêmicos (LEAL et al 2005). Mas, ainda assim existem muitos trechos remanescentes de mata preservada pelo Brasil inclusive no estado de Pernambuco.

Diante da velocidade do fenômeno de devastação da caatinga, unidades de conservação têm sido criadas. Atualmente, a caatinga conta com 47 unidades de conservação que somam 4.956km², aproximadamente 6,4% do bioma (SILVA et al. 2004). Dentre essas unidades temos o Parque Nacional da Serra do Catimbau (PARNA

Catimbau), localizado no Sertão Pernambucano, distribuída entre os municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, com área de 607 km². Criado em 13 de dezembro de 2002, o PARNA Catimbau está inserido em uma região definida como área prioritária para pesquisa científica (MMA 2012).

A vegetação de caatinga é constituída, especialmente, de espécies lenhosas e herbáceas, de pequeno porte, na maioria das vezes dotada de espinhos, sendo, geralmente, caducifólias, perdendo suas folhas no início da estação seca, e de cactáceas e bromeliáceas.. As famílias mais frequentes são Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactaceae, sendo os gêneros *Senna*, *Mimosa* e *Pithecellobium* com maior número de espécies. Entre as diversas espécies da caatinga, várias plantas são notoriamente consideradas como medicamentosas de uso popular, pois diversos tecidos como folhas, cascas e raízes são comercializados em formas, muitas rudimentares, farmacêutica e pré-farmacêuticas em calçadas e ruas das principais cidades, bem como em mercados e feiras livres. (MOSCA, 2009)

2.2. PRODUTOS NATURAIS

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers que foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. (VILELA, 1977). Atualmente, define-se como Produto Natural aquele composto químico ou substância proveniente de um ser vivo que pode ser produzido em processos de síntese que inspiram parcial ou totalmente o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN& CRAGG 2012).

A alta diversidade química em produtos naturais, moléculas produzidas por organismos vivos, está relacionada com a disponibilidade de precursores e reações biossintéticas, além da sua função num determinado sistema biológico. A evolução das rotas biossintéticas dos produtos naturais está ligada às necessidades funcionais de seus ligantes, por isso há uma grande expectativa quanto à afinidade dos produtos naturais pelos diversos alvos biológicos existentes. Os produtos naturais possuem alta diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade quanto à ligação com receptores específicos (MOLINARI, 2009). A avaliação de áreas do conhecimento, em especial a de Produtos Naturais, tem sido realizada quase que continuamente nos últimos 25 anos, tornando-se um tema recorrente na ciência brasileira. O Nordeste brasileiro é tem se

destacado como uma região com grande potencialidade para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à área da farmacognosia e etnobotânica.

2.2.1 PLANTAS MEDICINAIS NA CAATINGA

Consideram-se como plantas medicinais aquelas que possuem atividade biológica, com um ou mais princípios ativos úteis à saúde, reconhecidos para cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, administradas sob qualquer forma, utilizando exclusivamente matéria-prima vegetal (FOGLIO et al., 2006). É sabido que o uso de plantas medicinais enquanto alternativa terapêutica está intrinsecamente ligada à história da humanidade. Até o século XIX, a utilização de plantas medicinais, aromáticas e condimentares foi a base da Medicina da época. Em meados do século XVI, a Botânica se tornou um ramo da ciência desmembrado da Medicina. Somente a partir do desenvolvimento da Química Orgânica na Alemanha, é que se avançou na produção de medicamentos sintéticos. O primeiro medicamento sintético - a aspirina, foi desenvolvido em 1892, pelo alemão Félix Hoffman (FONTE, 2004). No final do século XIX, as plantas passaram a ter um valor comercial mais significativo, pois a possibilidade de se isolar, purificar ou até mesmo sintetizar princípios ativos isolados de plantas impulsionaram a expansão das pesquisas farmacêuticas, principalmente após a Segunda Guerra Mundial. A partir da década de 50, após estudos envolvendo diversas áreas do conhecimento, o metabolismo secundário passou a ser mais bem compreendido. Estima-se que entre 70 – 90% da população tanto de países desenvolvidos como França, Itália e Alemanha quanto de países em desenvolvimento como o Brasil, México e Índia façam uso de produtos naturais com recorrente utilização do conhecimento popular, porém sob realidades diferentes em nível científico e industrial, dessa forma, sendo a medicina popular a principal fonte de prevenção, tratamento e manutenção da saúde de grande parte da população nestes países (WHO, 2011).

É certo que como as plantas medicinais estão relacionadas à humanidade, a evolução de ambas também está relacionada. A primeira evidência histórica do uso de plantas para fins de cura data de 3900 a.C. na Suméria. Os chineses cultivam plantas medicinais desde 3000 a.C. e os egípcios faziam expedições, coletas e cultivos de PMACs, também para uso cosmético já em 2300 a. C. (SILVA JUNIOR, 2003). O conhecimento tradicional de PMACs era fundamental e muitas vezes sinônimo de poder, pois a cura estava, para muitos povos, ligada às práticas mágicas e ritualísticas (FONTE, 2004). A eficácia das plantas medicinais no tratamento de diversas doenças e o conhecimento sobre

seu uso e preparo, transmitida de geração em geração de forma empírica, contribui para sua grande utilização por populações tradicionais. Na medicina natural existem premissas importantes, como o reconhecimento dos locais de aquisição, parte utilizada das plantas e principalmente o modo de preparo das espécies nativas, resgatando as técnicas terapêuticas amplamente utilizadas no passado, preocupando-se em registrar o modo informal de aplicação dos saberes para a valorização da medicina popular (GOMES, 2007).

Atualmente, o alto custo dos medicamentos industrializados, as dificuldades da população em receber assistência médica e a tendência de uso de produtos de origem natural têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal (BADKE et al., 2012). Dessa forma, o retorno ao natural é uma garantia de busca racional de melhores condições de saúde, com base no que a natureza oferece (JACOBY et al., 2002), havendo, portanto, crescente interesse acadêmico pela medicina tradicional, pois o reconhecimento de que a base empírica pode ter comprovação científica, vinda do conhecimento dos povos tradicionais, fornece subsídios para estratégias de manejo e uso adequado de determinados ambientes (OLIVEIRA et al., 2010). Portanto, a preservação deste conhecimento e suas técnicas terapêuticas é uma maneira de deixar registrado um modo de aprendizado informal que contribui para a valorização da medicina popular (PILLA et al., 2006).

O uso de plantas medicinais ainda é frequente, tanto no meio rural quanto no urbano, principalmente por parte da população carente, que recorrem à vegetação nativa, em busca da cura de seus problemas (MOSCA & LOIOLA; 2009). Estudos sobre a composição florística e a estrutura dos remanescentes de caatinga que apresentam boas condições de conservação são importantes ferramentas para o entendimento de aspectos da ecologia regional, fornecendo bases para a sua conservação ou exploração sustentável (GUEDES et al 2012). Plantas da caatinga como Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), Pau-d'arco-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), Mulungu (*Erythrina mulungu*), Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*), Mororó (*Bauhinia forficata*), Sucupira (*Bowdichia virgiloides*), Angico (*Anadenanthera peregrina*), Umburana (*Amburana cearenses*), Jatobá (*Hymenaea courbaril*) entre muitas outras são usadas frequentemente. (PAULINO et al, 2011; ROQUE et al, 2010) Estas espécies podem ser consideradas ameaçadas devido às técnicas destrutivas para a obtenção do produto (a exemplo da retirada da casca do caule, afetando os sistemas condutores da planta). Tais espécies são comercializadas em feiras livres locais até mesmo em feiras das capitais dos estados (SOUZA GOMES, 2008).

Diversas atividades biológicas de plantas da caatinga tem sido comprovadas e reportadas mediante avaliação científica dos conhecimentos transmitidos popularmente tais como atividade anti-parasitária (FRASSON, 2012), atividade antimicrobiana (SILVA et al 2012; SILVA et al 2012; TRENTIN et al 2011), antioxidante (ARANDA-SOUZA, et al 2012), antitumoral (MELO et al 2011), anti-inflamatória (ROQUE, 2010), dentre outras.

2.3. *Eugenia brejoensis*, UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae possui cerca de 3.100 espécies divididas em aproximadamente 140 gêneros, separados em duas subfamílias: Leptospermoideae e Myrtoideae (segundo APG II modificado por JUDD et al. 1999; WATSON & DALLWITZ 2007). A sub-família Leptospermoideae distribui-se principalmente nas Américas do Sul e Central, apresenta apenas a tribo Myrteae e três subtribos, Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae, totalizando 70 gêneros e 2400 espécies; Já a sub-família Myrtoideae concentra-se na Austrália com 70 gêneros e 700 espécies no total. (BRIGGS & JOHNSON, 1979). No Brasil ocorrem 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies da subfamília Myrtoideae (CARDOSO & SAJO 2006). A família Myrtaceae corresponde a 1,32% do total das Angiospermas conhecidas, o que é bastante representativo, considerando-se um total de 400 famílias (JUDD et al 1999) e apresenta-se distribuída na maioria das formações vegetais do Brasil (SOARES-SILVA, 2000). O maior gênero da família Myrtaceae, é o *Eugenia L.* estimado em 1.009 espécies, distribuídos a partir do Sul do México, Cuba, Brasil, Antilhas para o Uruguai e Argentina, com um pequeno número de espécies na África (GOAVAERTS et al. 2008).

As espécies de *Eugenia* apresentam um importante papel ecológico nas florestas tropicais (LANDRUM & KAWASAKI 1997; CARDOSO & SAJO 2006; RAMOS et al. 2010). Elas dispersam suas sementes por proporcionar frutos comestíveis, os mesmos são atrativos para muitos tipos de animais. As diversas espécies *Eugenia* são apreciadas por seus frutos comestíveis, tais como a pitanga, *E. uniflora* (LEE et al. 1997) e, jacutinga, *E. edulis* (HUSSEIN et al. 2003).

Eugenia brejoensis (MAZINI & CASTRO 2008) é uma das espécies endêmicas do estado de Pernambuco, encontrada em regiões de brejo, localizadas na ‘caatinga’, é conhecida popularmente como “cutia” (figura 2). Os usos populares da mesma tem sido apontado para as ações antidiarreica, antifebril e anti-reumática a partir de folhas, frutos,

casca e caule porém por apresentar descrição botânica recente podem apresenta uma série de possibilidades ainda inéditas na espécie e que vem sendo avaliadas em nosso grupo. Estudos recentes comprovam a presença de atividade antimicrobiana contra bactérias a partir de diversas partes da planta. (SILVA et al. 2011; AZEVEDO et al 2012).

Figura 2 – *Eugenia brejoensis* (folha)



Fonte: Herbarium Network (disponível em:

<<http://intermountainbiota.org/portal/taxa/index.php?taxon=167944>> acessado em: 23/01/2014
às 20:14

2.4. *Myroxylon peruiferum*, UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA FABACEA

A Família Leguminosae Juss. ou Fabaceae Lindl. é a terceira maior família de angiospermas do mundo, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies. Trata-se de uma das famílias de maior presença na região da caatinga, sobretudo as espécies

leguminosas (SAMPAIO et al 2002). É dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, (Faboideae), sendo que a última subfamília é a maior com 476 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies (LEWIS et. AL, 2005); em Mimosoideae, encontre-se 77 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (APG II, 2003; LUCKOW, 2003); Caesalpinioideae é formada por 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies (DOYLE et. al., 2000).

Figura 3 – *Myroxylon peruiferum*



Fonte: <<http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/2012/08/myroxylon-peruiferum-l-f.html>>
acessado em 18/01/2014 às 1:18 horas

Uma vez pertencente a família Fabaceae (ex Leguminosae Papilionoideae), o *Myroxylon peruiferum* também conhecida como cabriúva, pau-de-bálsamo e bálsamo do Peru é uma planta decídua, heliófita, de 10 a 20 metros de altura, com folhas compostas

pinadas (LORENZI, 2008). É muito usado em produtos madeireiros em outras regiões do país assim como produtos não madeireiros, apresenta aplicação medicinal, na apicultura e na extração de óleo vermelho utilizado para tinturas. Dentre as atividades farmacológicas, destaca-se o uso como anti-inflamatório e expectorante peitoral, sendo utilizado popularmente em casos de asma, bronquite asmática, cistite, bronquites, dor de cabeça, feridas externas, tosse e sintomas das vias aéreas, diarreias e infecções urinárias (SCHULTES & RAFFAUF 1990; TAYLOR 1998). A atividade anti-microbiana foi avaliada recentemente e seus extratos apresentaram pela primeira vez na literatura atividades contra *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* e *Salmonella* spp (GONÇALVES et al 2011)

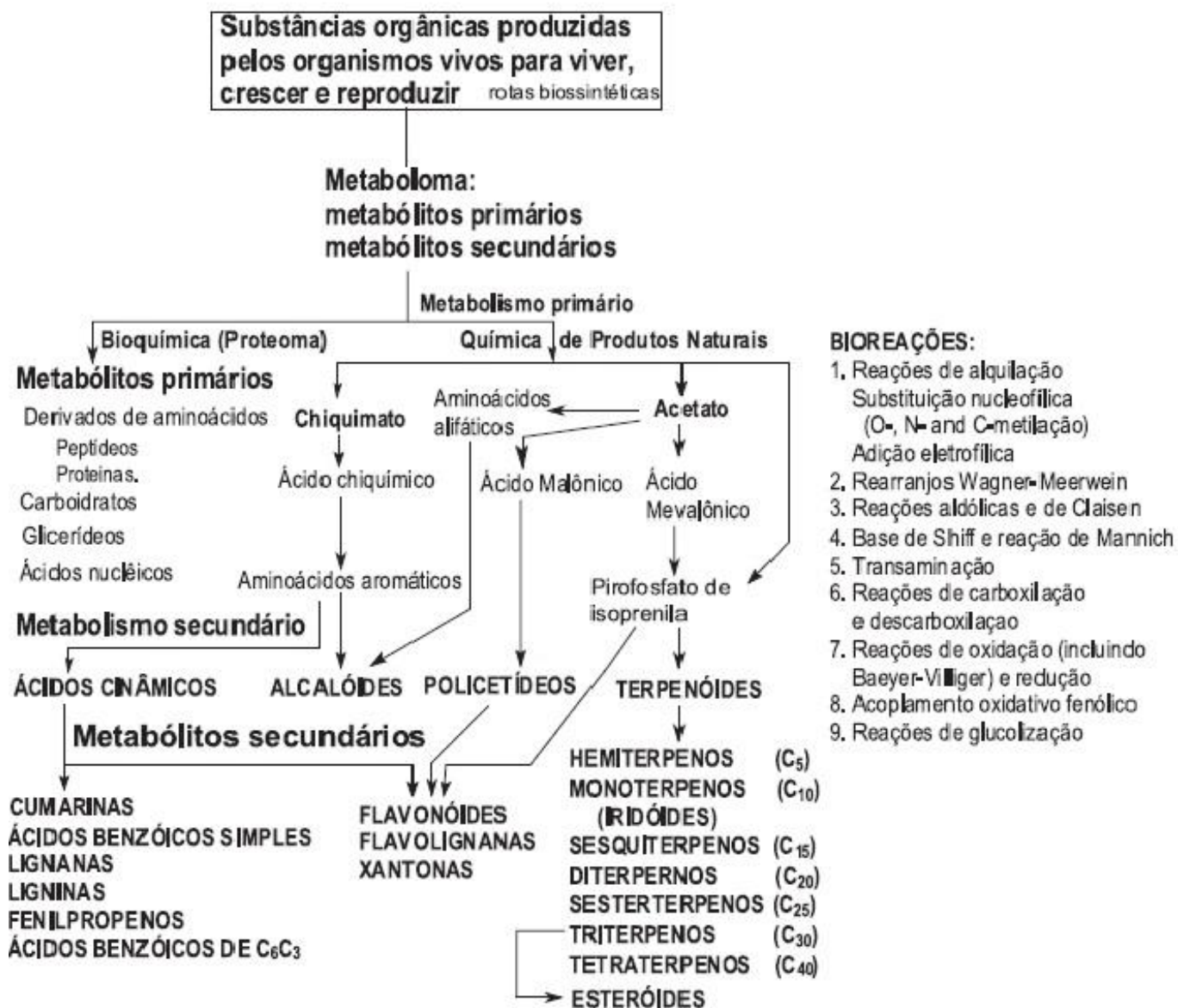
2.5. METABOLISMO SECUNDÁRIO

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário. Metabólitos secundários, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presente em todos eles o que, dentre outras coisas, permite a diferenciação entre as espécies. Estes produtos têm como função proteger a planta contra herbivoria, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Os metabólitos secundários podem ainda favorecer a atração de polinizadores, de dispersores de sementes e microorganismos simbiotes. Além disso, a produção destes componentes pode proteger a planta de fatores externos como variações de temperatura, umidade, exposição à radiação ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (ATSA, 1989). Tem sido verificado que muitos dos compostos secundários são benéficos à saúde humana principalmente por suas ações farmacológicas amplamente evidenciada na literatura (PICOLI et al 2010). São conhecidos por serem sintetizados em células especializadas e em diferentes estágios de desenvolvimento, por isso cada família, gênero ou espécie de planta produz uma categoria química característica ou uma mistura deles, podendo em alguns casos serem utilizados para classificação taxonômica dos vegetais (BELL et al. 1980).

Uma das estratégias de sobrevivência de plantas em ambientes adversos é o aumento na síntese de produtos do metabolismo secundários. Os metabólitos secundários estão em menor parte envolvidos em funções vitais das plantas, mas destaca-se a atuação

nos mecanismos de defesa dos vegetais. A literatura tem comprovado que esses compostos estão envolvidos nos efeitos biológicos das plantas medicinais. Os produtos resultantes deste metabolismo são comuns entre certos grupos taxonômicos, ou exclusivos para determinada espécie. A química de produtos naturais (QPN) de vegetais – fitoquímica, como é concebida atualmente, se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos. (TORSELL, 1997). Uma classificação simples para os metabólitos secundários inclui três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico ou piruvato e 3-fosfoglicerato. Os alcalóides, compostos secundários nitrogenados, são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos. Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; saponinas, carotenóides e a maioria dos hormônios vegetais são terpenos; nicotina e cafeína são alguns exemplos de alcalóides. (BELL et al. 1980).

Figura 4. *Principais vias de biossíntese dos metabólitos primários e secundários.*



Fonte: BRAZ FILHO, Raimundo (2010)

O isolamento de metabólitos secundários de plantas consiste em um estudo fitoquímico que compreende basicamente três etapas: 1) Coleta e classificação botânica

da espécie a ser estudada; 2) Extração e purificação dos constituintes químicos; 3) Caracterização e determinação estrutural.

Na primeira etapa, depois de estabelecido a planta e local de coleta, o material botânico deve ser encaminhado a um herbário, onde será feita a identificação e registro da planta (nomes científico e popular, família botânica, local e data da coleta, indicações terapêuticas, entre outros).

As amostras coletadas são prensadas, secas e armazenadas para posterior preparação dos extratos. A extração refere-se à separação, a partir dos tecidos das plantas (folhas, frutos, raízes, etc.) mediante o uso de solventes seletivos. A preparação de extratos é feita geralmente por percolação (método de extração a frio) ou Soxhlet (método de extração a quente). Para uma única extração (a frio ou a quente) usa-se geralmente um solvente polar (metanol ou etanol); para mais de uma extração utiliza-se pelo menos três tipos de solventes: apolar (hexano ou éter de petróleo), de polaridade moderada (clorofórmio ou diclorometano) e polar (metanol ou etanol). Os diferentes tipos de solventes utilizados irão extrair preferencialmente alguns compostos, como listados na tabela abaixo.

Tabela 1 –Relação solventes/Metabólitos secundários extraídos

SOLVENTE(S)/ SOLUÇÕES EXTRATORAS	PRINCIPAIS COMPOSTOS EXTRAÍDOS
Hexano	Cumarinas de Furano; Lipídeos, pigmentos e ceras
Clorofórmio, Éter etílico e Diclorometano	Terpenos, Alcaloides, Antraquinonas, Esteroides, Glicosídeos cardiotônicos
Acetato de etila, butano	Cumarinas, Flavonóides, Terpenos e Esteróides
Etanol e Metanol	Heterosídeos
Misturas hidroalcólicas e Água	Saponinas, Taninos, Flavonóides e Açúcares

Para a caracterização e identificação dos compostos os principais métodos utilizados são cromatografia gasosa e líquida e métodos espectroscópicos como: ultravioleta visível (UV-VIS), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). Técnicas unidas (hifenadas) têm sido bastante utilizadas na caracterização de compostos, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). A cromatografia gasosa é rápida e sensível podendo detectar substâncias na ordem de nanogramas (10^{-9} g) a picogramas (10^{-12} g), podendo indicar o número de compostos de uma mistura, a presença de impurezas e muitas vezes o esclarecimento aproximado da identidade de um composto. Com um espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo gasoso, diversas varreduras de massas em pontos diferentes dos picos cromatográficos podem ser feitas, fornecendo a relação massa/carga de íons que pode ser usada para cofirmar a massa molecular do composto. A identificação dos grupos químicos é feita comparando o espectro obtido com o de uma amostra pura ou com os espectros de uma biblioteca de referência (FIFIELD et al. 1995).

2.5.1. ÓLEOS ESSENCIAIS

Define-se Óleo essencial como um produto obtido por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação a seco (RUBIOLO, 2010). É um termo empregado para designar líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por processos específicos (MOUCHREK FILHO, 2001). O termo “óleo volátil”, tem sido mais usado devido à relação com as propriedades físico-químicas da planta, já que “óleo essencial” pode designar também produtos odorantes não formados anteriormente no vegetal, que são as “essências heterosídicas” obtidas através da hidrólise enzimática de heterosídeos (GONÇALVES et al., 2003 ; SILVA et al., 2003). Os Óleos Essenciais não são substâncias puras, sendo portanto constituídos por variadas classes de compostos apolares, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros, sendo que a grande maioria, é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, Principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos (RODRIGUES et al 2013; SIMÕES et al., 2010).

Os componentes químicos dos óleos essenciais podem ser classificados em dois grupos de origem distinta: o grupo dos terpenos e o grupo de compostos aromáticos derivados do fenilpropano. Sendo que, apenas os terpenos mais voláteis estão presentes nos óleos essenciais, ou seja, aqueles cujo peso molecular não é tão alto: mono e sesquiterpenos. Os monoterpenos estão quase sempre presentes, podendo ser acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos chegando a constituir acima de 90% do óleo essencial (BRUNETON, 1995). Os Óleos Essenciais geralmente são obtidos a partir de flores, frutos, raízes, caule, ervas, madeira e ervas daninhas sendo armazenados em células secretoras, células epidérmicas, tricomas, dutos e canais. (BAKKALI, 2008; BURT, 2004). Segundo SIMÕES e SPITZER (2010), embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar conforme a localização (a exemplo, o óleo das cascas de canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto, as folhas e raízes dessa planta são ricas, respectivamente, em eugenol e cânfora). A aplicação de óleos essenciais varia de lugar para lugar, e parecem depender da disponibilidade, o tipo e a eficácia das plantas adequadas em diferentes localizações geográficas. Dentre as aplicações genéricas, destacam-se o uso na arte da perfumaria e aplicações odoríferas industriais, aplicações baseadas no sabor, importantes na indústria de alimentos e bebidas e as propriedades físico-químicas são aproveitadas no uso de solventes e emulsivos industriais. No entanto, do ponto de vista biológico, um grande número de plantas tem sido relatado por possuir as mais variadas propriedades tais como inseticida, anti-nutricional e repelência para insetos de produtos armazenados, assim como atividade herbicidas (JAYASEKARA et al., 2005; POONPAIBOONPIPAT et al., 2013). Os óleos essenciais além de desempenharem papéis ecológicos importantes na proteção das plantas, atuam como antibacterianos, antioxidante e citotóxicas, antivirais, antifúngicos, inseticidas, dentre outras. Devido a essas propriedades, principalmente a antimicrobiana, o uso desses óleos nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia está se difundindo cada vez mais como alternativa aos produtos sintéticos (MONTANARI, 2010)

Do ponto de vista tecnológico, a busca de novos fármacos oriundos de plantas é um processo interativo de descoberta de protótipos moleculares (lead compounds ou templates), a partir do fracionamento biomonitorado de espécies vegetais, seguido de melhoramento dos protótipos pelo planejamento e síntese de análogos, visando incrementar propriedades farmacológicas (LEE, 2004). Acoplado a esse paradigma pode

ser observado o aumento no emprego dos óleos essenciais como fontes alternativas a outros produtos dispostos no mercado. O Brasil é um grande produtor de óleos essenciais. Embora as plantas aromáticas, condimentares e medicinais constituam fontes reais e potenciais matérias-primas de crescente demanda, seu cultivo não recebe a devida atenção. Quanto à produção brasileira, cerca de 80% dos óleos essenciais se destina ao mercado externo. Sendo que esta provém do cultivo de um limitado número de espécies exóticas introduzidas e de espécies nativas em processo de puro extrativismo (CORAZZA, 2002). A busca de Óleos Essenciais de plantas da caatinga teve início no Brasil na década de setenta na UFC, muitos compostos analisados se transformaram em produtos e subprodutos importantes para a indústria e a saúde.

2.5.2 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (RAVEN et al. 2001). São formados pela fusão de unidades de cinco carbonos que quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos, podendo referir-se, ocasionalmente, a todos os terpenos como isoprenóides (TAIZ et al. 2004). Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que constituem: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos, (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e carotenos (C₄₀) (OLIVEIRA et al. 2003).

Os hemiterpenos são classificados como o menor grupo dos terpenos e seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativos (CROTEAU et al. 2000). Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno. Devido a sua baixa massa molecular, estes costumam ser voláteis, sendo os constituintes das essências voláteis e óleos essenciais, atuando na atração de polinizadores, principalmente. Os sesquiterpenos são encontrados nos óleos essenciais e em hormônios vegetais, constituindo a maior classe de terpenóides (OLIVEIRA et al. 2003). Os diterpenos compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos e antimicrobianos (ROBBERS et al. 1997, CROTEAU et al. 2000; OLIVEIRA et al. 2003). Os triterpenos formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos encontra-se uma importante classe de substâncias, os esteróides, os quais são componentes dos

lipídios de membrana e precursores de hormônios esteróides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas, que nas plantas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (PERES, 2004). Os carotenóides são pigmentos responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e púrpura dos vegetais, apresentando função essencial na fotossíntese e, especialmente, na pigmentação de flores e frutos. Os politerpenóides são aqueles com mais de oito unidades de isopreno, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, como os longos polímeros encontrados na borracha (ROBBERS et al. 1997; CROTEAU et al. 2000; OLIVEIRA et al. 2003).

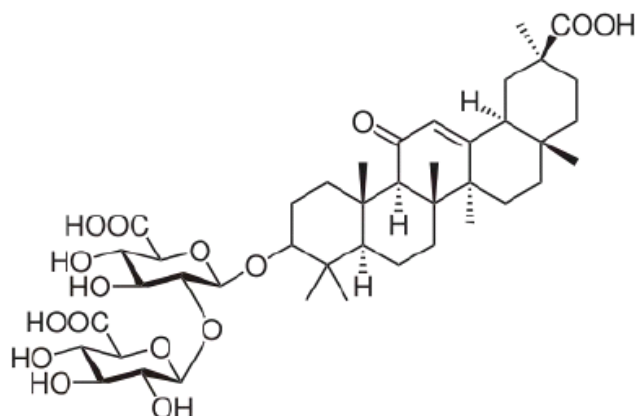
Os terpenos apresentam inúmeras atividades biológicas de interesse farmacêutico, dentre elas estão as ações anestésica local (DOLARA et al. 2000), citotóxica (KHIEV et al. 2012), anti-helmintica (NIRMAL et al., 2007) e, mais notadamente, antimicrobiana (GALVÃO et al. 2012).

2.5.3 Propriedades biológicas e farmacológicas das saponinas triterpênicas

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determinam a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes. (SCHENKEL et al., 2007). As saponinas triterpênicas fazem parte da família dos terpenos que é a maior família de compostos naturais sendo constituída por mais de 40000 moléculas diferentes.

As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou, ainda, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. Assim, quanto a aglicona, denominam-se saponinas esteroidais e triterpênicas (figura 1). O caráter ácido pode ser devido à presença de um grupo carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares ou em ambos. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio (SCHENKEL et al., 2007).

Figura 5 – *Saponina triterpênica*



Fonte: SIMÕES, et al. 2007

As saponinas estão presentes em pelo menos 400 espécies de plantas pertencentes a 60 famílias diferentes e em alguns animais, dentre eles o pepino do mar (WINA et al., 2005). Nas plantas, ocorrem em partes diferentes tais como: raiz, tubérculo, casca, folhas, sementes, e frutos. As saponinas triterpênicas são encontradas principalmente nas plantas dicotiledôneas, categoria que abrange as gramíneas (SCHENKEL et al., 2007). As saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, relacionados com o sistema de defesa. São encontradas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos (WINA et al., 2005).

O comportamento anfifílico (compostos que apresentam na mesma molécula uma parte apolar e uma parte polar) das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas determinam várias propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade, ou causando sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão as atividades hemolíticas, ictiotóxicas e moluscolíctica e espermicida (SCHENKEL et al., 2007).

2.5.4 Propriedades biológicas e farmacológicas dos flavanóides

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Uma “substância fenólica ou polifenólica” é aquela

que possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais(ésteres,éteres, glicosídeos e outros)(SCHENKEL et al., 2007).

Segundo Schenkel (2007), os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural.Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal. Podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais, entretanto,a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental,constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas.

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES et al. 2000; HARBORNE, WILLIAMS, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002).Ainda de acordo com Schenkel (2007), são conhecidos, até o presente, mais de 4200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, freqüentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares.

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto, e em muitos casos ainda é empírico, embora alguns resultados indiquem os flavonóides como mutagênicos, em geral, são considerados benéficos. (SCHENKEL et al., 2007).

Ensaio biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonóides exibem uma grande ação sobre tais sistemas demonstrando diversas atividades atribuídas aos representantes da classe, atividades antivirais, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias, antitumorais, hormonais, atividade sobre a permeabilidade capilar e atividade espermicida (SCHENKEL et al., 2007; PELZER et al. 1998).

2.6 CRESCIMENTO POPULACIONAL E O CONTROLE DA NATALIDADE

As altas taxas de crescimento na população mundial representam um grande obstáculo para o bem estar da humanidade, uma vez que esta depende principalmente dos recursos econômicos e naturais disponíveis no mundo. Nos últimos anos a população mundial ultrapassou os seis bilhões de habitantes e estima-se ainda que até 2050 sofra um aumento de 50% principalmente nos países em desenvolvimento, segundo informações do Fundo de População das Nações Unidas, (2011). No caso do Brasil a população em

1970, por exemplo, era de 94 milhões de habitantes e em 2010 essa população chegou aos 190 milhões de habitantes, duplicando-se em menos de 40 anos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (IBGE). Apesar da velocidade do crescimento populacional haver diminuído, ainda existe uma grande preocupação em controlar, o aumento da população (IBGE, 2010).

Diversos métodos anticoncepcionais são descritos pela literatura médica como alternativa para evitar uma gravidez não planejada, variando entre as diversas classes, formas de atuação e variações em efetividade. Nesse contexto existem quatro grandes classes de contraceptivos, os naturais, também chamados de métodos comportamentais, os hormonais, os cirúrgicos, os intra-uterinos (DIU) e os métodos de barreira (BURNHILLU, 1998).

2.6.1 Métodos de Barreira

Os métodos de barreira consistem no uso de substâncias ou produtos que impeçam a fecundação dos espermatozóides no óvulo estabelecendo barreiras físicas ou químicas. Entre os mais conhecidos estão os métodos mecânicos tendo seu principal representante o preservativo masculino, uma membrana que envolve o pênis e que tem por função reter o sêmen no ato sexual impedindo a fecundação, além dos diafragmas vaginais que têm por função impedir a entrada dos espermatozóides no útero (GÓMEZ et al. 2007).

Para aumentar a efetividade dos métodos supracitados, é feita uma associação das barreiras físicas e químicas. O agente químico frequentemente utilizado nessa associação é o composto biodetergente de ação enzimática denominado Nonoxynol-9 (N-9) (SCHILL; WOLFF, 1991). Sua atuação está evidenciada sobre o metabolismo celular, agindo também como um microbicida, uma vez que este tem a capacidade de romper membranas celulares e envelopes virais (BIRD, K.D, 1991). N-9 é um agente surfactante não iônico e tem como principal ação a redução da tensão superficial na membrana do acrossoma do espermatozóide, causando uma alteração na sua permeabilidade, perda da motilidade e a diminuição de seu potencial frutolítico (FORBES; HEISE, 2003).

As atividades espermicidas destes surfactantes estão associadas com sua afinidade estrutural com a membrana lipídica (SCHILL; WOLFF, 1981). No entanto, diversos estudos demonstram que tais biodetergentes espermicidas não fornecem nenhuma proteção contra doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e que seus efeitos no controle da transmissão do HIV ainda são bastante controversos (RODDY et al. 2002).

A principal desvantagem descrita no uso do N-9 e outros biodetergentes espermicidas usados atualmente de mesma atividade tensoativa é seu efeito sobre as células epiteliais da vagina e na sua microbiota normal (KLEBANOFF, 1992). O uso de tais surfactantes repetidamente como contraceptivos vaginais ou microbicidas está associado com um aumento do risco de infecções vaginais ou cervicais e de irritações ou ulcerações (WEIR et al. 1995; REKART, 1992; NIRUTHISARD; RODDY; CHUTIVONGSE, 1991). Tais perturbações são capazes de desencadear processos infecciosos por patógenos oportunistas, aumentando as chances de contrair o HIV ou outras DSTs (D'CRUZ ; UCKUN, 2001). Mediante tais efeitos adversos justifica-se a importância na avaliação e pesquisa de uma nova geração de agentes contraceptivos que tenham diferentes mecanismos de ação e possam ser usados pelos mesmos propósitos através da administração de doses eficazes, sem causar danos irritativos ou tóxicos.

2.6.2 Extrato de plantas como fonte alternativa para a nova geração de contraceptivos químicos.

Os vegetais são indiscutivelmente fontes excepcionais de compostos bioativos. Esses compostos são cruciais para o desenvolvimento de novas drogas devido sua elevada diversidade molecular, muito superior aos dos compostos derivados dos processos de síntese química. Essa variedade e complexidade dos metabólitos vegetais é resultado de sua formação que sofre influência de estímulos ambientais, bastante variáveis, de natureza química, física e biológica, sobre sua composição química, culminando em moléculas de estruturas complexas e com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (ALVES, 2001; RISSATO et al. 2004).

Em pesquisas realizadas por Gómez et al. (2007) na busca de novas alternativas contraceptivas foi encontrada uma ampla variedade de plantas que apresentam atividade espermicida, permitindo assim pensar em novas propostas para um anticonceptivo de origem vegetal, constituindo uma estratégia chave na prevenção da gravidez não planejada especialmente nos grupos mais vulneráveis que é o caso das adolescentes.

Diversas espécies, relatadas na literatura, apresentam efeito sobre o controle da fertilidade, uma vez que possuem atividades espermicidas. Estas variam quanto a seus mecanismos de ação. A maioria dos espermicidas derivados de plantas é do tipo saponinas titrerpênicas, de vários tipos de estruturas, além dos flavonóides e dos compostos fenólicos(GÓMEZ et al. 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Obter e Caracterizar Óleos Essenciais a partir de folhas de duas plantas da caatinga pernambucana: *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* e em seguida analisar o efeito dos mesmos sobre a viabilidade, motilidade em espermatozoides humanos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos Óleos essenciais sobre a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em células Vero
- Caracterização química por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa dos Óleos Essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum*
- Analisar a atividade espermaticida/espermostática dos extratos em questão utilizando como modelo espermatozoides humanos in vitro;

- Efetuar uma ampla revisão sobre o efeito citoprotetor contra H₂O₂ como um método de análise de atividade antioxidante de plantas

4. REFERÊNCIAS

AI, H., WANG, F., LEI, C., 2008. Antioxidant activities of protein-enriched fraction from the larvae of housefly, *Musca domestica*. **Nat. Prod. Res.** 22 (6), 507–515.

ALVES, T.M.; RIBEIRO F.L.; KLOOS H.; ZANI C.L.; Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.

ANDRADE, A. P. de.; COSTA, R. G. da.; SANTOS, E. M.; SILVA, D. S. da. Produção animal no semiárido: o desafio de disponibilizar forragem, em quantidade e com qualidade, na estação seca. *Tecnol. e Ciên. Agropec.*, João Pessoa, v. 4, n. 4, p. 01-14, dez. 2010.

APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal Of the Linnean Sosciet.** v. 141. p. 399-436, 2003

ARANDA-SOUZA, M. A. ; SOUZA, R. M. ; SILVA JÚNIOR, C. A. ; SILVA, L. C. N. ; PEREIRA, D. S. T. ; SILVA, M. V. ; CORREIA, M. T. S. . Antioxidant potential and total phenolic content of leaf extracts from *Parkinsonia aculeata* L. cultivated in Brazilian Caatinga biome . *Current Topics in Phytochemistry*, v. 11, p. 95-101, 2012.

AZEVEDO, P. R., ; SILVA, L. C. N. ; SILVA, A. G. ; ARAÚJO, J. M. ; MACEDO, A. J. ; SILVA, M. V. . Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. *Scientia Plena*, v. 8, p. 1-4, 2012.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. *Texto & Contexto Enfermagem*, v.21, n.2, p.363-370, 2012.

BAKKALO, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M.M. Biological effects of essential oils- areview. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 446-475.

BIRD, K.D. The use of spermicide containing Nonoxynol-9 in the prevention of HIV infections. *AIDS*, v. 5, n. 7, p. 791-796, 1991.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V.C. (2003) Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Itajaí, UNIVALI.

BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 33, n. 1, 2010 .

BRUNETON, J. Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. New York: Lavoisier Publishing, 1995

BRIGGS, B.G. & JONHSON, L.A.S. 1979. Evolution in the Myrtaceae - Evidence from inflorescence structure. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales** **102**(4): 160-256.

BURNHILLU, B.S. Contraceptive use: the US perspective. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 62, n. 1, p. 17-23, 1998.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94, 223-253

CARDOSO CMV, SAJO MG (2006) Nervacao foliar em especies brasileiras de MyrtaceaeAdans. **Acta Bot Bras** 20(3):657-669

CHEN, C.; TANG, H.; SUTCLIFFE, L. H.; Belton, P. S.; J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 5710

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L.; WAGNER, J.R. Measurement of oxidatively generated base damage to nucleic acids in cells: facts and artifacts. **Bioanalytical Rev**, p. 1-20, 2012, *in press*.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos (2004) In. SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis, Brasil 519-535.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. v. 2, 627 p

CORAZZA, S. Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros. São Paulo: Editora SENAC2002.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; STEVEN R.; KLEEBERGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 122, p. 456–70, 2008.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. Natural Products (Secondary Metabolites) (2000) In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists 1250-1318.

D'CRUZ O.J.; UCKUN F.M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, n. 2, p. 113-123, 2001.

DIAS, CN, RODRIGUES KA, CARVALHO FA, CARNEIRO SM, MAIA JG, ANDRADE EH, MORAES DF. Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) SKEELS from Brazil. **Chem Biodivers**. 2013 Jun;10(6):1133-41. doi: 10.1002/cbdv.201200292.

SILVA, J. M. R.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITIJAVILAT, S.; **Agric. Food Chem.** 1991, 39, 1549

DI STASI, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, L.C. (Ed.). Plantas Medicinais: Arte e Ciência . Um Guia de Estudos Multidisciplinar São Paulo: Ed. Universidade Paulista. 1996b. p.109-127.

DOYLE J., Towards comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL and non-molecular data. In: Herenden PS, Bruneau A(eds) **Advances in Legume Systematics 9**. Royal Botanic Gardens, UK, pp 1-20, 2000.

DOLARA, P. LUCERI, C., GHELARDINI, C., MONSERRAT, C. (2000) Local Anaesthetic, Antibacterial and Antifungal Properties of Sesquiterpenes from Myrrh. *Planta Medica* 66, 356-358.

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; ALBUQUERQUE, S. G.; NASCIMENTO, C. E. S.; CAVALCANTE, J. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: Seminário para avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. EMBRAPA/CPATSA, UFPE e Conservation International do Brasil, Petrolina. 2000.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, p. 495-516, 2007. p. 747-754, 2013.

FEARON, I.M.; FAUX, S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. **J Mol Cell Cardiol**, v. 47, p. 372–81, 2009.

FIFIELD, F.W., HAINES, P.J., (1995). Environmental analytical Chemistry. London, Blackie Academic & Professional, 424.

FOGLIO MA, QUEIROGA CL, SOUSA IMO, RODRIGUES RAF 2006. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo multidisciplinar. *Construindo a História dos Produtos Naturais*. http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm, acesso em Janeiro de 2014. (13:54 06.01.2014)

FONTE, N. N. A complexidade das plantas medicinais: algumas questões de sua produção e comercialização. Curitiba: UFPR, 2004.

FORBES, A.; HEISE, H. What's up with Nonoxynol-9? **Reproductive Health Matters**, v. 8, n. 16, p. 156-159, 2000.

FRANKEL, E. D.; FINLEY, J. W.; **J. Agric. Food Chem.** **2008**, 56, 4901

FRANÇA RODRIGES, KA, AMORIM, LV, OLIVEIRA, JMG, “Eugenia uniflora L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on Leishmania amazonensis and Possible Mechanisms of Action,” **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, Article ID 279726, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/279726

FRASSON, A. P. ; SANTOS, O. ; DUARTE, M. ; TRENTIN, D. S. ; GIORDANI, R. B. ; Silva, A. G. ; SILVA, M. V. ; TASCA, T. ; MACEDO, A. J. . First report of anti-Trichomonas vaginalis activity of the medicinal plant Polygala decumbens from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. **Parasitology Research** (1987. Internet), v. 110, p. 2581-2587, 2012.

GOMES, E. C. S.; BARBOSA, J.; VILAR, F. C. R.; PEREZ, J. O.; RAMALHO, R. C. Plantas da Caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2., 2007, João Pessoa. Anais... João Pessoa: CEFET-PB, 2007.

GONÇALVES, AL; ALVES FILHO, H.M Antimicrobial effects of some Brazilian Medicinal Plants against intestinal disroders **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 153-160, maio/ago. 2011 - ISSN 1983-1870

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON. LANDRUM, L.R.; MATSUMOTO, K.; Mazine, F.F.; Lughadha, E.N.; Proença, C.; Soares-Silva, L.H.; Wilson, P.G. & Lucas, E. 2008. **World Checklist of Myrtaceae**. Royal Botanic Garden, Kew. 455p.

GÓMEZ, A.M.A.; MAYA, W.D.C.; ÁLVAREZ, J.F.C.; JIMÉNEZ, S.; CADAVID, A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. **Actas Urológicas Españolas**, v. 31, n. 4, p. 372-381, 2007.

GUEDES , R. S. et al. Caracterização Florístico-Fitossociológica do Componente Lenhoso de um trecho de caatinga no semiárido paraibano. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p.99-108, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. E. I.; Anal. **Biochem.** 1987, 165, 215

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Sinopse do Censo Demográfico 2010**. Disponível em: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=4&uf=00> Acesso em: 23 fev, 2012.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic Biol Med.**, v. 46, p. 531-42, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2003. 936 p.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, n.1, p. 572-584, 2002.

HUSSEIN SAM, HASHEM ANM, SELIEM MA, LINDEQUIST U, NAWAAR MAM (2003) Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry** 64:883–889

KITSATI, N.; FOKAS, D.; OUZOUNI, M.D.; MANTZARIS, M.D.; BARBOUTI, A.; GALARIS, D. Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H₂O₂-induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. **J Agri Food Chem**, v. 60, p. 7873-7879, 2012.

KOWALTOWSKI, A.J.; DE SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-43, 2009.

LANDRUM, L. R.; Kawasaki, M. *Brittonia* **1997**, 49, 508–536.

LI, Y.; QIAN, Z.J.; RYU, B., LEE, S. H., KIM, M. M. & KIM, S. K. 2009. Chemical components and its antioxidant properties *in vitro*: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. **Bioorg. Med. Chem.** 17:1963-1973.

LIU, L.; GU, L.; MA, Q.; ZHU, D.; HUANG, X. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 17(1), 88-94. (2013).

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, v.1, 2.ed., 1998. 352p.

MASGRAS, I.; CARRERA, S.; DE VERDIER, P.J.; BRENNAN, P.; MAJID, A.; MAKHTAR, W. et al. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. **J Biol Chem**, v. 287, p. 9845-54, 2012.

MOREIRA, P.I.; NUNOMURA, A.; NAKAMURA, M.; TAKEDA, A.; SHENK, J.C.; ALIEV, G. et al. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. **Free Rad Biol Med**, v. 44, p. 1493–505, 2008

PLETJUSHKINA, O.Y.; FETISOVA, E.K.; LYAMZAEV, K.G.; IVANOVA, O.Y.; DOMNINA, L.V.; VYSSOKIKH, M.Y. et al. Hydrogen peroxide produced inside mitochondria takes part in cell-to-cell transmission of apoptotic signal. **Biochemistry**, v. 71, p. 60–67, 2006.

JACOBY, C. et al. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade rural de Guamirim, município de Irati, PR. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v.4, n.1, p.79-89, 2012.

JAYASEKARA, T. K.; STEVENSON, P. C.; HALL, D. R. AND BELMAIN, S. R. Effects of volatile constituent from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain. *Journal of Chemical Ecology*, v. 31, n. 2, p. 303-312, 2005.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland, Sinauer Associates, Inc. p. 464, 1999.

KOWALTOWSKI, A.J.; DE SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-43, 2009.

LEAL, I. R.; VICENTE, A.; TABARELLI, M. Herbivoria por caprinos na caatinga da região de xingó: uma análise preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. da. *Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 822, 2003.

KLEBANOFF S.J.; Effects of the spermicidal agent nonoxynol-9 on vaginal microbial flora. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 1, p. 19-25, 1992.

LEAL, I. R.; SILVA, J. M. C. da; TABARELLI, M.; LACHER JR, T. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Mega diversidade**, v. 1, n. 1, Julho 2005

LEE M, NISHIMOTO S, YANG L, YEN AY, HATANO T, YOSHIDA T, OKUDA T (1997) Two macrocyclic hydrolysable tannin dimmers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry** 44:1343–1349.

LEWIS GP. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens, Kew , 577p, 2005.

LINO DE MOURA, FM; ARREGUY BAPTISTA, R.I.A; MENDES, V.V; MOURA, A.P.B; COSTA, M.M Use of plants Caatinga biome in control of pathogens of interest food area - A review *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.2, p.125-136, 2013

LUCKOW L., A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: Klitgaard BB, Bruneau A (eds) **Advances in Legume Systematics 10, High Level Systematics**. Royal Botanic Gardens, UK, pp 197- 220, 2003.

MARQUES, S.C. Enciclopédia Técnica Universal. Porto Alegre: Editora Globo, 1958. v.2.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2008**, 158, 775/777.

MELO, J.G, SANTOS, AG; AMORIM, ELC; NASCIMENTO, SC; ALBUQUERQUE, U.P “Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach,” **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2011, Article ID 365359, 14 pages, 2011. doi:10.1155/2011/365359

MMA – Ministério do Meio Ambiente (2002) Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco, Conservation International, Fundação Biodiversitas.

MOLINARI, G. Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology – Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.655, p.13-27, 2009.

POONPAIBOONPIPAT, T.; PANGNAKORN, U.; SUVUNNAMEK, U.; TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on

barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products*, v. 41, p. 403-407, 2013

MONTANARI, R. M. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardi, Siparunaceae e Verbenaceae. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2010

MOUCHREK FILHO, V. E. **Introdução à Química de Óleos Essenciais**. São Luís, 2001. 72p. Apostila

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. **Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil**. *Revista Caatinga*, v.22, n.4, p. 225-234, 2009

NASCIMENTO, E. A. Produção e Composição do óleo essencial de alfavaquina (Ocimum sello; Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 6, p. 8-14, 2003

NEWMAN DJ, CRAGG GM **Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010**, 461-477 (2012)

NIRMAL S.A., GIRME, A.S., BHALKE, R.D. (2007) Major constituents and anthelmintic activity of volatile oils from leaves and flowers of *Cymbopogon martini* Roxb. **Natural Product Research** 13, 1217-1220.

NIRUTHISARD S.; RODDY R.E.; CHUTIVONGSE S. The effects of frequent nonoxynol-9 use on the vaginal and cervical mucosa. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 18, n. 3, p. 176-179, 1991.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA-NETO, J.M. Plantas medicinais

utilizada em comunidades rurais de Oeiras, semi-árido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.282-301, 2010.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. (2003) Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, 64.

RAINS, J.L.; JAIN, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Rad Biol Med**, v. 50, p. 567–75, 2011.

REKART M.L. The toxicity and local effects of the spermicide Nonoxynol-9. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 5, n. 4, p. 425-426, 1992.

REN, J.; SHI, J.; KAKUDA, Y.; KIM, D.; XUE, S.J.; ZHAO, M. et al. Phytohemagglutinin isolectins extracted and purified from red kidney beans and its cytotoxicity on human H9 lymphoma cell line. **Separation and Purification Technology**, v. 63, p. 122-8, 2008.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1603-16, 2010.

RODDY, R.E.; ZEKENG, L.; RYAN, K.A.; TAMOUFÉ, U.; TWEEDY, K.G. Effect of Nonoxynol-9 Gel on Urogenital Gonorrhea and Chlamydial Infection. **The Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 9, p. 1117-1122, 2002.

ROQUE, A.A., ROCHA, R.M., LOIOLA, M.I.B, 2010. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio

Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 12, 31–42.

PEREZ, C e SUAREZ, C, *Am. J. Chin. Med.* **25**, 181 (1997) Antifungal activity of Plants Extracts against *Candida albicans* 1997

RAMOS, M. F. D. S.; MONTEIRO, S. D. S.; DA SILVA, V. P.; NAKAMURA, M. J.; Siani, A. C. **Journal of Essential Oil Research** **2010**, 22, 109–113.

RISSATO, S.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. **Salusvita**, v. 23, n. 2, p. 209–222, 2004.

Sampaio, E.V.S.B., Giulietti, A.M., Virginio, J., Gamarra-Rojas, C.F.L., 2002. Vegetação e flora da caatinga, Plantas do Nordeste: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, Recife, 49–90

YAMAGUCHI, F.; ARIGA, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H.; J. **Agric. Food Chem.** 2000, 48, 180

RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; LIBERTO, E.; CORDERO, C.; BOCCHI, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. **Flavour Fragr. J.** **2010**, 25, 282–290

SCHILL W.B.; WOLFF H.H. Ultrastructure of human spermatozoa in the presence of the spermicide nonoxinol-9 and a vaginal contraceptive containing nonoxinol-9. **Andrologia**, v. 13, n. 1, p. 42–49, 1981

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, F. **The healing forest. Medicinal and toxic Plants of the Northwest Amazonia**. Portland, USA: R.F. Dioscorides Press, 1990

SILVA, A. G. ; SILVA, L. C. N. ; BEZERRA FILHO, C. M. ; ARAUJO, D. R. C. ; SILVA, J. F. ; ARRUDA, I. R. S. ; ARAUJO, J. M. ; CORREIA, M. T. S. ; MACEDO, A. J. ; SILVA, M. V. . Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil .Current Topics in Phytochemistry, v. 11, p. 81–94, 2012

SILVA, LCN ; JANA MESSIAS SANDES ; MAURÍCIO MAGALHÃES DE PAIVA ; JANETE MAGALI DE ARAÚJO ; REGINA CÉLIA BRESSAN QUEIROZ DE FIGUEIREDO; SILVA, M. V. ; MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA . Anti-Staphylococcus aureus action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. Natural Product Research (Print), v. 27, p. 1–5, 2012.

SOUZA GOMES, EC Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 2, p. 074–085, mai/ago 2008

TAYLOR, L. **Herbal secrets of the Rainforest**. Rocklin, CA: Prima Publishing Inc., 1998.

TERAMOTO, S.; TOMITA, T.; MATSUI, H.; OHGA, E.; MATSUSE, T.; OUCHI, Y. Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. **The Jap J Pharmacol**, v. 79, p. 33–40, 1999.

TRENTIN, D. S. ; GIORDANI, R. B. ; ZIMMER, K. R. ; Silva, A. G. ; SILVA, M. V. ; CORREIA, M. T. S. ; BAUMVOL, I. J. R. ; MACEDO, A. J. . Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 327-335, 2011.

PAULINO, G. M.; ALVES, B. J. R.; BARROSO, D. G.; URQUIAGA, S.; ESPINOLA, J. A. A. (2011) Fixação biológica e transferência de nitrogênio por leguminosas em pomar orgânico de mangueira e graviola. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.12, 1598-1607 p.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; OSVALDO, J.A.; GERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Il Farmaco**. v. 53, p. 421-424, 1998.

PERES, L. E. P. (2004) *Metabolismo Secundário*. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz 1-10.

PICOLI, Andressa Araujo et al . Avaliação de biorreguladores no metabolismo secundário de beterrabas inteiras e minimamente processadas. **Bragantia**, Campinas , v. 69, n. 4, Dec. 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052010000400025&lng=en&nrm=iso>. access on 09 Jan. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000400025>

PILLA, M.A.C.; AMOROZO, M.C.M. & FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.20, p.789-802, 2006.

PRADO, D. E. (2003) As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (Eds) *Ecologia e conservação da caatinga*. Ed. Universitária da UFPE. Cap. 1. 3-73 p.

RATES SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603-613 Use of plants Caatinga biome in control of pathogens of interest food area - A review ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. (1997) *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 327.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil) **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.1, p.31-42, 2010

SAMPAIO, E.V.S.B.; GIULIETTI, A.M., VIRGINIO, J., GAMARRA-ROJAS, C.F.L., 2002. Vegetação e flora da caatinga, Plantas do Nordeste: Centro Nordestino de Informações sobre Plantas, Recife, 49–90.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 711-740. TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2004) *Fisiologia Vegetal* 3. ed. Porto Alegre: Artmed.

SILVA, A. F. I BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L) POIT. (LAMIACEA), Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 6, p. 1-7, 2003.

SILVA JUNIOR, A. A. *Essentia herba – Plantas Bioativas, volume 1*. Florianópolis:

Epagri, 2003. *Essentia herba – Plantas Bioativas, volume 2*. Florianópolis: Epagri, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Essenciais. IN: SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Da Planta ao Medicamento**, cap. 18, Rio Grande do Sul: editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010

SOARES - SILVA, L. H. **A família Myrtaceae - Subtribos:** Myrciinae e Eugeniinae na Bacia Hidrográfica do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.

TONELLO, K.C; TEIXEIRA, J.F ECOFISIOLOGIA DE TRÊS ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA DO BRASIL EM DIFERENTES REGIMES DE ÁGUA

TORSSELL, K. B. G.; *Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach* (2nd ed.), Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society: Stockholm, 1997.

Vilela, J. D.; *Rev. Paul. Med.* **1977**, 89, 115.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. Piracicaba: ESALQ 2003 26p. (documentos florestais nº 17)

WATSON L, DALLWITZ MJ (2007) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://delta-intkey.com>. Acessado em 28/12/2012.

WEIR S.S.; RODDY R.E.; ZEKENG L.; FELDBLUM P.J. Nonoxynol-9 use, genital ulcers, and HIV infection in a cohort of sex workers. **Genitourinary Medicine**, v. 71, n. 2, p. 78-81, 1995.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponincontaining plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8093-8105, 2005.

XU, Y.; BRADHAM, C.; BRENNER, D. A.; CZAJA, M.J. Hydrogen peroxide-induced liver cell necrosis is dependent on AP-1 activation. **Am J Physiology**, v. 273, p. 795-803, 1997

YANG, X.; KANG, M.C.; LEE, K.W.; KANG, S.M.; LEE, W.W.; JEON, Y.J. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassumringgoldianum* subsp. *coreanum*. *Algae*, v. 26, p. 201-208, 2011.

5. ARTIGOS

5.1 ARTIGO I

Artigo a ser submetido à revista New Biotechnology.

***Atividade Espermicida de Óleos essenciais de Croton sp., Eugenia brejoensis e
Myroxylon peruiferum: três espécies de plantas da Caatinga***

Clovis Macêdo Bezerra Filho¹, Thiago Henrique Florencio de Oliveira², José Adelson Alves do Nascimento Júnior², Risonildo Pereira Cordeiro², Luis Cláudio Nascimento da Silva¹, Alexandre Gomes da Silva¹, Marcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹

¹Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil

²Faculdade ASCES, 55016-400, Caruaru-PE, Brasil

Autor Correspondente:

Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil. **Fone: (081) 2126-8540.**

Email: mtscorreia@yahoo.com.br

***Atividade Espermicida de Óleos essenciais de Croton sp., Eugenia brejoensis e
Myroxylon peruiferum: três espécies de plantas da Caatinga***

Resumo

Diversos medicamentos à base de vegetais são descritos na literatura em todo o mundo como fatores regulatórios da fertilidade desde os tempos antigos. Este estudo foi realizado para obter, caracterizar e avaliar o efeito *in vitro* dos óleos essenciais de três espécies de plantas endêmicas da Caatinga: *Croton* sp., *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* sobre o estresse oxidativo induzido na presença de H_2O_2 e sobre a motilidade de espermatozoides humanos. Os óleos foram obtidos por hidrodestilação e caracterizados por GC/MS, sendo *Croton* sp. a única espécie cujo rendimento do óleo foi insatisfatório para prosseguimento dos estudos. Amostras de sêmen foram coletadas de 12 indivíduos voluntários férteis, com idades de 18 a 45 anos, após uma abstinência sexual de 48-120 horas. Diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$) foram testadas em microplacas para ambos os OE, sendo realizados seis ensaios independentes e em triplicata para cada uma das concentrações. Ambas as plantas exibiram ação espermostática de maneira dose-dependente. Os melhores resultados foram obtidos para *Eugenia Brejoensis* em todos os tempos de tratamento apresentando IC₅₀ de 28,99 (5 min), 35,19 (15 min) e 14,79 (30 min), entretanto *Myroxylon peruiferum* também mostrou um potencial imobilizante significativo com IC₅₀ 42,92 (5 min), 46,32 (15 min) e 41,69 (30 min). Este estudo demonstrou pela primeira vez que os OE de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* apresentam propriedade espermostática potencial sobre os espermatozoides humanos, outros trabalhos visando caracterizar os mecanismos de ação desses óleos, bem como de seus compostos majoritários são alvos de pesquisa já executados pelo nosso grupo.

Palavras-chave: Atividade Espermicida, óleo essencial, espermatozoides humanos.

Spermicidal Activity of Plants from the Caatinga (Northeast Brazil)

Abstract

Several herbal medicinal plants are described in the literature worldwide as regulatory factors of fertility since ancient times . This study was conducted to obtain, characterize and evaluate *in vitro* effect of essential oils of three species of endemic plants of Caatinga : . *Croton* sp , *Eugenia brejoensis* and *Myroxylon peruiferum* on the oxidative stress induced in the presence of H_2O_2 and the motility from human sperm. The oils were obtained by hydrodistillation and characterized by GC / MS , and *Croton* spp. the only species whose oil yield was insatisfatório for further education . Semen samples were collected from 12 fertile volunteers , aged 18 to 45 years after a sexual abstinence 48-120 hours . Different concentrations (25, 50 , 100, 200, 400 mg / mL) were tested in microplates for both EO six independent assays being performed in triplicate and for each concentration . Both plants exhibited espermostática action in a dose- dependent manner . The best results were obtained for *Eugenia Brejoensis* in all treatment times having IC₅₀ of 28.99 (5 min) 35.19 (15 min), and 14.79 (30 min) , however, showed a significant *Myroxylon peruiferum* também immobilizing potential with IC₅₀ 42.92 (5 min) 46.32 (15 min), and 41.69 (30 min) . This study first demonstrated that OE *brejoensis* de *Eugenia* and *Myroxylon peruiferum* property espermostática present on human potential , sperm other studies aiming to characterize the mechanisms of action of these oils and their major compounds are targets of research already performed by our group .

Keywords: spermicidal activity, essential oil, human spermatozoa.

Introdução

Diversos métodos anticoncepcionais são descritos pela literatura médica como alternativa para evitar uma gravidez não planejada, variando entre as diversas classes, formas de atuação e variações em efetividade. Os métodos de barreira, por exemplo, consistem no uso de substâncias ou produtos que impeçam a fecundação dos espermatozoides no óvulo estabelecendo barreiras físicas ou químicas [1]. Os espermicidas vaginais, entre eles os cremes, géis, aerossóis espumantes, etc., representam o grupo dos métodos químicos de barreira [2].

Os agentes sintéticos para o controle da fertilidade podem produzir diversos efeitos colaterais graves como distúrbios hormonais, hipertensão, aumento no risco de se desenvolver um câncer e do ganho de peso [3]. Os avanços farmacêuticos com o uso de plantas como medidas terapêuticas ou preventivas vêm ganhando espaço no mundo nas últimas décadas no que se refere às medidas contraceptivas, além do mais, na busca de novos anticonceptivos espermicidas que não mostrem ter efeitos secundários importantes [4].

Os espermicidas são substâncias desenhadas para prevenir a gravidez mediante a morte ou imobilização dos espermatozoides para que estes não consigam chegar até o ovócito e fecundá-lo [5]. Os espermicidas são um método de fácil acesso e de baixo custo, sendo elaborados em diferentes apresentações como cremes, espumas, óvulos ou tabletes, no entanto, apesar de suas vantagens, são elaborados em sua grande maioria à base de nonoxynol-9, compostos são capazes de causar efeitos irritativos cervicais e vaginais podendo favorecer o aparecimento de microrganismos infecciosos e/ou a alteração do crescimento de lactobacilos [6-7]. Tendo, portanto, uma urgente necessidade de substituição desses agentes por uma alternativa segura e eficaz, como os contraceptivos à base de plantas. Diversos medicamentos à base de vegetais são descritos na literatura em todo o mundo como fatores regulatórios da fertilidade desde os tempos antigos [4].

Eugenia brejoensis, espécie endêmica da Caatinga pernambucana pertencente à família da Myrtaceae, recentemente descrita e identificada como *Eugenia brejoensis* Mazine [8]. A família Myrtaceae compreende um vasto número de gêneros (pelo menos 132) e 5671 espécies. As aplicações econômicas e terapêuticas dessa família são abrangentes, na literatura já descritas por vários outros autores no tratamento de disenteria, gastroenterites, dores de estômago, indigestão, diabetes mellitus e hipertensão [9-13].

Myroxylonperuiferum L., pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como Cabreúva, é encontrada na grande maioria do território brasileiro, se estendendo principalmente na região da Caatinga [14-15]. A madeira é utilizada para construção, móveis e outros fins [16], o tronco fornece, após resultado de lesão o bálsamo de tolú, utilizado na perfumaria, e como agente anti-inflamatório à base de plantas para doenças do trato respiratório, reprodutor e urinário [17]. *Myroxylon peruiferum* tem como parte de sua composição fitoquímica, óleos voláteis, ésteres, álcoois, triterpenos, alcalóides, fenóis, proteínas e glicosídeos [18].

Ao avaliarmos a capacidade espermicida de plantas endêmicas de nossa região, indicamos materiais como fontes de subsídios contraceptivos eficazes na regulação da fertilidade, minimizando os efeitos colaterais dos que são utilizados atualmente. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito *in vitro* de óleos essenciais de plantas endêmicas da Caatinga sobre a motilidade de espermatozoides humanos.

Materiais e Métodos

Coleta de Material Vegetal

As amostras de folhas de *Eugenia brejoensis* e de *Myroxylon peruiferum* foram coletadas do Parque Nacional do Catimbau (Buíque, Pernambuco, Nordeste do Brasil em Setembro de 2012). A identificação botânica foi feita no Herbário do Instituto de Pesquisa Agrônômica de Pernambuco (IPA-PE), Brasil, os espécimes (vouchers) (IPA 84.033), (IPA 84.113), respectivamente, foram depositados no mesmo herbário.

Extração do Óleo Essencial

Aproximadamente 200 gramas de pó de folhas de cada uma das plantas (previamente secas à temperatura ambiente e trituradas em moinho) foram submetidas ao processo de hidrodestilação sob aquecimento durante 3 horas. A metodologia utilizou o hidrodestilador, em seguida o Óleo Essencial foi coletado e guardado em refrigerador, sendo mantido na temperatura de 4 °C. A caracterização química dos óleos utilizados foi realizada anteriormente por nosso grupo através de Cromatografia Gasosa (Tabela 1).

Preparação da Suspensão de Sêmen

As amostras de sêmen foram coletadas por masturbação por 12 indivíduos voluntários férteis, previamente testados, não-fumantes, saudáveis com idades de 18 a 45 anos, com morfologia normal em mais de 60% e motilidade maior que 40%. As amostras de sêmen foram coletadas após uma abstinência sexual de 48-120h, como preconizado pelo protocolo padrão da OMS [19]. Uma análise seminal de rotina foi avaliada logo após a liquefação à temperatura ambiente. Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi firmado com cada voluntário antes da participação no estudo. A pesquisa só foi iniciada após a autorização do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da nossa instituição.

Cultura celular

A linha de fibroblastos de rim de macaco (Vero) foi mantida a 37 ° C numa incubadora com atmosfera húmida com 5 % de CO₂ . As células foram cultivadas em meio RPMI contendo 10 % de soro fetal de bezerro inativado pelo calor, penicilina e estreptomicina (100 U / mL) , todos da Sigma - Aldrich .

MTT

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT , que mede a conversão metabólica do 3 - (4,5- dimetiltiazol - 2 - il) -2,5 - difeniltetrazolio (MTT ; Sigma - Aldrich) para o sal de corante de formazan. Células Vero (1 x 10⁵/mL) foram incubadas em uma placa de 96 poços em quadruplicata, durante 24 h . As células foram então tratadas com óleo (0,625-10 uM) durante 30 min e subsequentemente com H₂O₂ (1 mM) durante 24 h . No final da incubação , o meio foi removido e uma solução de MTT (5 mg / mL em meio RPMI) foi adicionado às células que foram incubadas durante mais 3 h . Em seguida, o meio foi removido e o produto de formazan intracelulares formados foram dissolvidos em DMSO . A densidade óptica (DO) foi medida a 595 nm em um leitor de microplacas (benchmark plus, Bio- Rad , Califórnia , EUA). A viabilidade celular foi calculada em comparação com a densidade óptica obtida por célula de controle considerado como 100 % .

Análise da Atividade Imobilizante e Determinação IC₅₀

Diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 400 µg/mL) para ambos os óleos (pré-aquecidos a 37°C) foram misturados ao ejaculado humano na proporção volumétrica de

1:1. Para o ensaio controle, os ejaculados foram misturados à solução salina (pH 7.4) contendo 5% de DMSO a 37 °C na mesma proporção 1:1. Para a avaliação inicial da motilidade, 10 µl de sêmen foi imediatamente (pós liquefação) colocados em 2 lâminas e pelo menos 10 campos foram visualizados e 400 espermatozoides foram contados, 200 em cada. Os ensaios foram então realizados em triplicata para cada uma das concentrações supracitadas, além dos poços para o controle, em microplacas. Após incubação, dentro de 5 min, 15 min e 30 min, a motilidade espermática foi avaliada seguindo o Protocolo de Processamento Seminal da OMS (2010). [19] Os ensaios para as duas plantas foram realizados de forma independente, sendo testados 6 pacientes para cada óleo.

A determinação da IC_{50} (concentração que imobilizou 50% dos espermatozoides) foi realizada por regressão linear, a partir dos valores de imobilização relativa (IR) ao controle para cada tratamento segundo a fórmula descrita abaixo:

$$IR (\%): \frac{(MEIT - MEIC) \times 100}{MEIC}$$

Onde, MEIT é a média de espermatozoides imóveis no tratamento; MEIC é a média de espermatozoides imóveis no controle.

Análise Estatística

Todos os testes serão realizados em triplicata e com pelo menos três experimentos independentes. Os resultados serão expressos como média com desvio padrão. A significância estatística será mensurada pelos testes t de "Student" e ANOVA comparando os grupos tratados com o controle não tratado, considerando significativo $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação do efeito protetor dos Óleos essenciais frente ao estresse oxidativo

Após o tratamento de células Vero submetidas a estresse oxidativo por meio de peróxido de hidrogênio com óleos essenciais das duas plantas, a viabilidade celular foi calculada em comparação com a densidade óptica obtida por célula de controle (sem óleo), considerado como 100 %, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente

significativa, não sendo, portanto, nenhum dos óleos capaz de reverter o estresse oxidativo.

Imobilização Espermática

O efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais da *Eugenia brejoensis* e do *Myroxylon peruiferum* sobre a motilidade dos espermatozoides humanos são demonstrados nas Figuras 1 e 2 respectivamente. Os espermatozoides humanos foram tratados com diferentes concentrações (25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL) dos dois óleos e em intervalos de tempos diferentes (5, 15 e 30 min).

Quando tratados com *Eugenia brejoensis*, houve ação imobilizante em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$) e em todos os tempos do ensaio, com exceção da concentração de 25 µg/mL nos intervalos de 5 e 15 min, em que não houve uma ação imobilizante significativa ($p > 0,05$). Ao comparar a variação de imobilização para cada tempo de incubação, partindo da concentração mínima a máxima (25 a 400 µg/mL), a variação foi de $21,04 \pm 5,25\%$ a $64,22 \pm 4,29\%$ para 5 minutos, $26,57 \pm 4,89\%$ a $70,67 \pm 5,61\%$ para 15 minutos e de $21,30 \pm 5,82\%$ a $77,67 \pm 5,52\%$ para 30 minutos.

O potencial imobilizante das diferentes concentrações do óleo essencial de *Eugenia brejoensis* é apresentado na Figura 1. Após 5 minutos de incubação o melhor percentual de imobilização relativa (205,24%) foi obtido para a concentração de 400 µg/mL ($p < 0,05$), embora que, é no intervalo de 30 minutos de exposição que a *Eugenia brejoensis* consegue desempenhar a melhor imobilização relativa (264,3%) (Tabela 2). Nos demais tempos de incubação não houve diferenças estatísticas entre as concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL ($p > 0,05$).

Para o *Myroxylon peruiferum*, somente a partir de 50 µg/mL pôde ser vista uma ação imobilizante significativa ($p < 0,05$). Para todas as outras concentrações maiores (100, 200 e 400 µg/mL), houve um efeito imobilizante significativo em todos os tempos ($p < 0,001$), sendo 200 e 400 µg/mL as melhores concentrações, cujos valores de imobilização relativa em 5 minutos são de 99,5% e 125,3%, respectivamente. Quando é comparada a variação de imobilização para cada tempo de incubação, partindo da concentração mínima a máxima (25 a 400 µg/mL), a variação foi de $26,60 \pm 10,59\%$ a $59,93 \pm 13,65\%$ para 5 minutos, $32,93 \pm 11,25\%$ a $65,67 \pm 4,89\%$ para 15 minutos, e de $37,40 \pm 9,25\%$ a $74,07 \pm 4,89\%$ para 30 minutos.

Quando os espermatozoides humanos foram tratados com os óleos, *Eugenia brejoensis* apresentou um potencial imobilizante maior que *Myroxylon peruiferum*, uma

vez que mesmo na concentração mínima testada (25 µg/mL), *Eugenia brejoensis* conseguiu desenvolver uma ação imobilizante significativa, mesmo que no maior intervalo de tempo (30 min), o que pôde ser visto em porcentagem de imobilização relativa 264,30% e 98,03% para *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum*, respectivamente (Tabela 2).

Na porcentagem relativa de imobilização e na determinação da IC₅₀ torna-se evidente o maior potencial imobilizante de *Eugenia brejoensis* em comparação a *Myroxylon peruiferum*, informação que é ratificada quando se compara o tempo mínimo de exposição aos óleos (5 min). Na concentração de 50 µg/mL *Eugenia brejoensis* foi capaz de alcançar uma imobilização relativa de 72,16%, como pode ser visto na Tabela 1, enquanto que *Myroxylon peruiferum* alcançou, na mesma concentração e tempo, uma imobilização relativa menor (52,38%). A eficiência relativa no tocante à capacidade de imobilizar os espermatozoides humanos apresentou em todos os tempos testados, melhor potencial imobilizante para *Eugenia brejoensis*, o que é representado por: em 5 min o óleo essencial de *Eugenia brejoensis* teve um potencial 48% melhor que o *Myroxylon peruiferum*, da mesma forma nos outros tempos, 15 min, 32%, e em 30 min, 181%.

Discussão

As medidas contraceptivas sintéticas para o controle da fertilidade podem produzir diversos efeitos colaterais graves, principalmente por distúrbios hormonais [3]. A busca por produtos naturais como medida anticonceptiva vem crescendo nas últimas décadas, principalmente na busca de espermicidas que não desenvolvam reações secundárias importantes [4], como, por exemplo, os efeitos decorrentes do uso de espermicidas elaborados à base de nonoxynol-9 [6-7].

Diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos potenciais de produtos vegetais como contraceptivos masculinos [20-24]. Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez o elevado potencial imobilizante dos Óleos Essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* sobre espermatozoides humanos.

Eugenia brejoensis apresentou os melhores resultados quanto ao efeito de imobilização relativa em comparação à outra planta testada. Esse estudo corroborou com pesquisas anteriores que correlacionaram plantas da família Myrtaceae e mais especificamente do gênero *Eugenia* à atividade anti-fertilidade [26-27]. Em um trabalho anterior um grupo de pesquisadores relatou uma atividade anti-fertilidade em ratos

através das flores de *Eugenia jambolana*, atuando na redução do número de espermatozoides [27].

Dos componentes químicos identificados em *Eugenia brejoensis* foi encontrado β -cariofileno (11,30%), resultado consistente com um estudo prévio que caracterizou o mesmo componente no óleo essencial de *Trachyspermum ammi* como tendo uma atividade contraceptiva significativa *in vitro* [20]. Os outros constituintes identificados biciclogermacreno (10,38%), δ -cadineno (15,33%), α -muurolol (8,43%), α -cadinol (8,12%) apresentaram atividade bactericida relatada em estudos prévios com óleo essencial [28], sendo destacado o biciclogermacreno. Também foram relatadas atividades anti-fúngicas para os constituintes β -cariofileno, α -cadinol [28] e δ -cadineno [31].

Myroxylon peruiferum embora tenha apresentado uma imobilização relativa menor que *Eugenia brejoensis*, ainda assim, mostrou um potencial imobilizante significativo. Estudos *in vitro* relataram uma atividade espermicida, em ratos, de espécies pertencentes à mesma família do *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae), *Abrus precatorius* [31-32] e *Pongamia glabra*, [33]. É válido enfatizar que para o gênero *Myroxylon* ainda não há relatos na literatura sobre o potencial contraceptivo.

Dos componentes químicos identificados em *Myroxylon peruiferum*, α -pineno (9,82%), γ -muuroleno (7,13%), espatulenol (16,44%), óxido de cariofileno (6,59%) ainda não foram relatadas atividades contraceptivas em estudos anteriores. Atividades fungicidas e bactericidas dos principais componentes foram relatadas para os componentes α -pineno, γ -muuroleno, óxido de cariofileno [34-35] e uma atividade antioxidante para todos os componentes identificados no *Myroxylon peruiferum* [36].

Em conclusão, este estudo demonstrou que os Óleos Essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* apresentam propriedade espermotática potencial sobre os espermatozoides humanos. A eficácia dos óleos de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* sobre a motilidade dos espermatozoides humanos foi avaliada *in vitro* com os experimentos já descritos. Os resultados demonstram que a ação imobilizante é dose-dependente. Futuras pesquisas que incluem a confirmação do efeito sobre a viabilidade dos espermatozoides e o mecanismo de ação das plantas através de microscopia eletrônica, estão em andamento.

Referências

- [1] Gómez AMA, Maya WDC, Álvarez JFC, Jiménez S, Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. *Actas Urol Esp* 2007; 31:372-81.
- [2] Batár I. State-of-the-art of non-hormonal methods of contraception: II. Chemical barrier contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2010; 15:89-95.
- [3] Goldzieher JW, Zama NM. Oral contraceptive side effects: Where's the beef? *Contraception* 1995; 52:327-35.
- [4] Kumar D, Kumar A, Prakash O. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. *J Ethnopharmacol* 2012; 140: 1-32.
- [5] Grimes DA, Lopez L, Raymond EG, Halpern V, Nanda K, Schulz KF. Spermicide used alone for contraception. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 4:CD005218.
- [6] Ojha P, Maikhuri JP, Gupta, G. Effect of spermicides on *Lactobacillus acidophilus* in vitro nonoxynol-9 vs. *Sapindus saponins*. *Contraception* 2003; 68:135-8.
- [7] Schreiber CA, Meyn LA, Creinin MD, Barnhart KT, Hillier SL. Effects of Long-Term Use of Nonoxynol-9 on Vaginal Flora. *Obstet Gynecol* 2006; 107:136-43.
- [8] Mazine FF, Souza VC. A new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. *Bot J Linn Soc* 2008; 158: 775-7.
- [9] Consolini AE, Baldini OAN. Amat, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J Ethnopharmacol* 1999; 66:33-9.
- [10] Riehl CAS. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). *Quim Nova* 2007; 30: 860-4.
- [11] Gutierrez RM, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 2008; 117:1-27.
- [12] Oliveira MDL. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46:371-6.

- [13] Birdi T. et al. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhea. BMC Complement Altern Med 2010; 10:33.
- [14] Lorenzi, H. 1992, *Myroxylonperuiferum* L. In: Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum,. p. 235.
- [15] Sebbenn AM, Siqueira ACMF, Kageyama PY, Machado JAR. Parâmetros genéticos na conservação da cabreúva - *Myroxylon peruiferum* L.F. Allemão. Scientia Forestalis 1998; 53:31-8.
- [16] Nogueira, JCB. Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas. In: Boletim Técnico. Instituto Florestal, São Paulo; 1977, p. 1-17.
- [17] Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. In: EMBRAPA-CPAC. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina; 1998, p. 464.
- [18] Lorenzi H, Matos FJA., Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. 1ed. Nova Odessa: Editora Plantarum; 2002, p.512.
- [19] World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. edition. Geneva; 2010.
- [20] Paul S, Kang SC. *In vitro* determination of the contraceptive spermicidal activity of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill fruits. N Biotechnol 2011; 28(6): 684-90.
- [21] Farnsworth NR, Waller DP. Current status of plant products reported to inhibit sperm. Res Front Fertil Regul 1982; 2:1-16.
- [22] Chakraborti K. et al. Sperm immobilization activity of *Allium sativum* L. and other plant extracts. Asian J Androl 2003; 5:131-5.
- [23] Dubey R, Dubey K, Sridhar C, Jayaveera KN. Sperm immobilization activity of aqueous, methanolic and saponins extract of bark of *Ziziphus Mauritiana*. Der Pharmacia Sinica 2010; 1:151-156.
- [24] Gallego G. et al. Efecto de cinco extractos de plantas colombianas sobre espermatozoides humanos. Rev Cubana Plant Med 2012; 17:84-92.
- [25] Guzick DS. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. N Engl J Med 2001; 345:1388-93.

- [26] Sussman LK.. Herbal medicine on Mauritius. J Ethnopharmacol 1980; 2: 259-78.
- [27] Rajasekaran M. et al. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers. J Ethnopharmacol 1988; 24(1):115-21.
- [28] Ahmad F, Salleh WM, Sirat HM, Yen KH. Chemical Compositions And Antibacterial Activity Of The Leaf And Stem Oils Of Piper Porphyrophyllum (Lindl.) N.E. Br. Excli J 2012; 11:399-406.
- [29] Chang HT. et al. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. Bioresour Technol 2008; 99: 6266-70.
- [30] Cakir A, Kordali S, Kilic H, Kaya E. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. Biochem Syst Ecol 2005; 33:245-56.
- [31] Morey RA, Khandagle AJ. Antifertility potential of *Abrus precatorius* against male albino mice. In Streams Res Journal 2011; 1(6): 25-30.
- [32] Saraswat R. Spermicidal Activity I Aqueous Extract Of *Abrus. Precatorius* (L.) I Male Albi O Rats. Pharmacologyonline 2011; 3:305-11.
- [33] Bandivdekar AH, Moodbidri SB. Spermicidal Activity Of Seed Oil Of *Pongamia Glabra*. Syst Biol Reprod Med 2002; 48:9-13.
- [34] Matasyoh JC, Kiplimo JJ, Karubiu NM, Hailstorks TP. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphorates*. Food Chem 2007; 101:183-87.
- [35] Policegoudra RS. et al. Bioactive constituents of *Homalomena aromatica* essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. Journal of Medical Mycology 2012; 22: 83-87.
- [36] Gürsoy N, Tepe B, Akpulat, HA. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Salvia palaestina* (Bentham) and *S. ceratophylla* (L.). Rec. Nat. Prod 2012; 6(3): 278-87.

Lista de Tabela (Table Captions)

Tabela 1: Caracterização Química dos Óleos Essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* por Cromatografia Gasosa.

Tabela 2: Efeito Imobilizante Relativo e IC50 dos óleos de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* sobre espermatozóides humanos.

Lista de Figuras (Figure Captions)

Figura 1. Efeito imobilizante do Óleo Essencial de *Eugenia brejoensis* sobre a espermatozóides humanos.

Figura 2. Efeito imobilizante do Óleo Essencial de *Myroxylon peruiferum* sobre a espermatozóides humanos.

Tabela 1: Caracterização Química dos Óleos Essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylonperuiferum* por Cromatografia Gasosa

<i>Eugenia brejoensis</i>		<i>Myroxylonperuiferum</i>	
Composto	Percentual	Composto	Percentual
β -cariofileno	11,30%	α -pineno	9,82%
biciclogermacreno	10,38%	γ -muuroleno	7,13%
δ -cadineno	15,33%	espatulenol	16,44%
α -muurolol	8,43%	Óxido de cariofileno	6,59%
α -cadinol	8,12%		

Tabela 2: Efeito Imobilizante Relativo e IC50 dos óleos de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* sobre espermatozóides humanos.

Concentração (µg/mL)	<i>Eugenia brejoensis</i>			<i>Myroxylon peruiferum</i>		
	Tempo (min)					
	5	15	30	5	15	30
25	42,85	35,29	86,26	23,30	23,27	25,84
50	72,16	64,11	126,18	52,38	50,40	53,11
100	118,36	125,42	219,47	72,93	67,20	68,27
200	155,07	142,53	239,22	99,49	85,62	81,28
400	205,24	165,99	264,29	125,31	99,39	98,03
IC50	28,99	35,19	14,79	42,92	46,32	41,69
R²	0,9934	0,9820	0,9785	0,9963	0,9949	0,9940

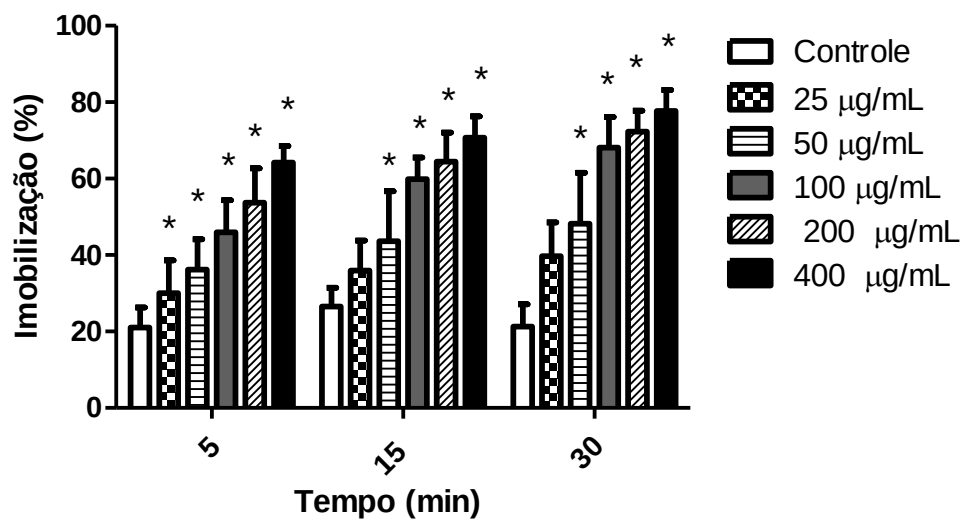


Figura 1. Efeito imobilizante do óleo de *Eugenia brejoensis* sobre a espermatozoides humanos. (*) Representa diferença estatística em relação ao controle.

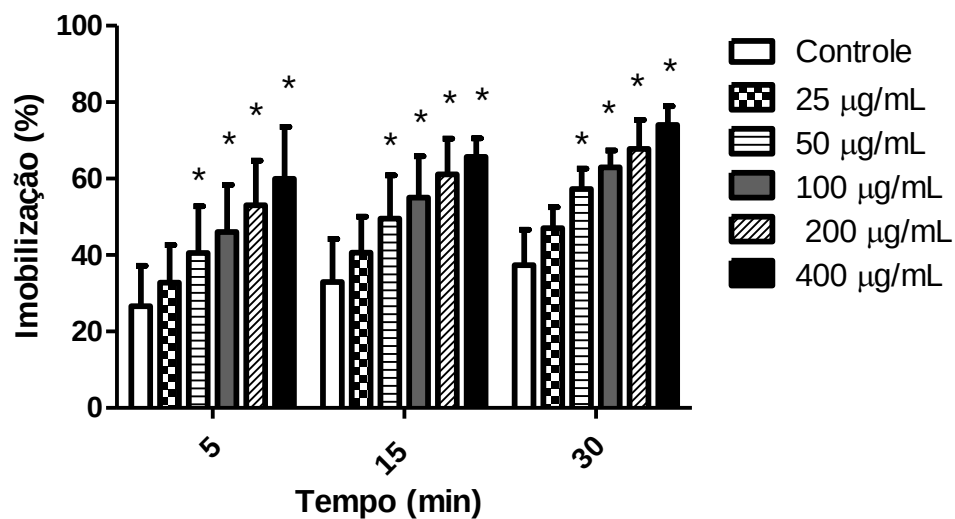


Figura 2. Efeito imobilizante do óleo de *Myroxylon peruiferum* sobre a espermatozoides humanos. (*) Representa diferença estatística em relação ao controle.

6. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais da caatinga constituem uma importante fonte de biomoléculas dotadas das mais variadas atividades biológicas. Em conclusão, este estudo caracterizou pela primeira vez o óleo essencial da espécie endêmica do sertão pernambucano, *Eugenia brejoensis*, assim como caracterizou o óleo de *Myroxylon peruiferum*. Adicionalmente, demonstrou-se que os óleos essenciais de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* não apresentam citotoxicidade para células Vero e apresentam propriedade espermostática potencial sobre os espermatozoides humanos. A eficácia dos óleos de *Eugenia brejoensis* e *Myroxylon peruiferum* sobre a motilidade dos espermatozoides humanos foi avaliada *in vitro* com os experimentos já descritos. Os resultados demonstram que a ação imobilizante é dose-dependente. Futuras pesquisas que incluem a confirmação do efeito sobre a viabilidade dos espermatozoides e o mecanismo de ação das plantas através de microscopia eletrônica, estão em andamento.

7. ANEXOS

7.1 ARTIGO Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquito of essential oils of *Eugenia brejoensis* Mazzini (Myrtaceae) leaves

Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquito of essential oils of *Eugenia brejoensis* Mazzini (Myrtaceae) leaves

Alexandre Gomes da Silva ^{1,2}, Renata Carla Corrêa Alves², Clovis Macêdo Bezerra Filho ², Patrícia Cristina Bezerra da Silva ⁵, Leilane Marina Moraes dos Santos ², Mary Ann Foglio ³, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro ^{*5}, Márcia Vanusa da Silva ^{*2} and Maria Tereza dos Santos Correia ⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

²Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

³Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade de Campinas, Campinas, Brasil

⁴Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

⁵Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco

* Corresponding author. E-mail addresses: dmafn@ufpe.br

Abstract

The essential oils of the leaves of *Eugenia brejoensis* from Brazil's northeastern caatinga were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-MS showed δ -cadinene (22.6%), β -caryophyllene (14.4%), α -muurolol (9.34%), α -cadinol (8.49%) and bicyclogermacrene (7.93%) as main constituents of *Eugenia brejoensis* leaf essential oil. The essential oil showed moderate larvicidal activity (CL_{50} = 214,7 ppm) against *Aedes aegypti* mosquito. Essential oils of Myrtaceae species revealed the constant presence of δ -cadinene, β -caryophyllene and bicyclogermacrene as a majors components corroborating our results.

Key words: Myrtaceae, Essential oils, Caatinga, *Aedes aegypti*, *Eugenia brejoensis*.

Introduction

Myrtaceae consists of 132 genera and 5,671 species¹, distributed mainly in tropical and subtropical regions of the world, with centers of diversity in Australia, Southeast Asia and South America, tropical and temperate zones with few species occurring in Africa.²

The largest of the New World Myrtaceae genera, *Eugenia* L. is currently estimated to contain 1009 species¹, distributed from South of Mexico, Cuba, the Antilles

to Uruguay and Argentina, with a small number of species (*ca.* 60) in Africa.³ Several species of *Eugenia* have been reported for uses in folk medicine. The shrubby tree *Eugenia uniflora* has been investigated and determined to be effective in treatment against digestive disorders and commonly used as an anti-febrile, antirheumatic, anti-inflammatory, diuretic and control blood glucose levels.⁴ *Eugenia* species have play important ecological roles in tropical forests.^{5–7} They disperse their seeds by affording edible fruits which are attractive to many kinds of animals. Several *Eugenia* species are appreciated for their edible fruits, such as *E. uniflora*⁸ and *E. edulis*.⁹ Also, some species are used in folk medicine for their antihypertensive, antifebrile, antirheumatic, antidiarrheic, (*E. uniflora* and *E. dysenterica*)^{10–13}, and anti-diabetic (*E. jambolana*) properties.¹⁴ These species accumulate volatile compounds in their leaves and fruits.^{4,15}

*Eugenia brejoensis*¹⁶ is a tree endemic to Pernambuco state, found in highland humid forests, locally called ‘*brejo*’, which are forests on ‘inselbergs’, located in the semi-arid ‘*caatinga*’ and is commonly known as “*cutia*”. Traditionally, the leaves, fruits, and stem-bark are used for antidiarrheic, antifebrile, antirheumatic for local people. A previous study has demonstrated the antibacterial activity of cutia leaf, stem-bark and fruit extracts.¹⁷

To our knowledge no study did so far address analysis of essential oil of *Eugenia brejoensis*, which led to the development of this work. This paper describes the chemical composition of essential oils from *Eugenia brejoensis* leaves collected in Caatinga Domain in northeastern Brazil. We report the larvicidal activity against *Aedes aegypti* mosquito vector of yellow and dengue fever associated to essential oil of *Eugenia brejoensis* leaves.

Materials and methods

Plant material

Leaves of *Eugenia brejoensis* were collected from mature trees in September 2010 in the Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco state, Brazil (Figure 1). A voucher specimens have been deposited in the herbarium IPA (Instituto Agronômico de Pernambuco) with the number IPA 84.033.

Extraction procedure

The leaves collected from *Eugenia brejoensis* (342 g) were dried at room temperature for 6 days, minced and submitted to hydrodistillation for 4 h in a Clevenger-type apparatus. The oils obtained were dried over anhydrous sodium sulphate, producing yield of 0.010% w/w and stored at a low temperature (-5 °C).

GC and GCMS analyses

GC–mass spectrometric (MS) analyses were carried out using a Agilent 5975C Series GC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) quadrupole instrument equipped with a Agilent J&W non-polar DB-5 fused silica capillary column (60 m x 0.25 mm i.d.; film thickness 0.25 µm). The analytical conditions of oven temperature was initially at 60 °C, held for 3 min, increased to 240 °C at 2.5 °C/min, then held for 10 min. The flow of carrier gas helium was maintained at a constant pressure of 100 kPa. Injector and detector temperatures were 250°C and 280°C, respectively. Injector mode was split 1:20 and ionization potential at 70 eV. Scan range was m/z 20 – 350 and scan rate, 0.5 scans/s (10). The same conditions were used in GC analysis performed in a Gas chromatography (GC) was performed using a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Trace GC Ultra gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), a split/splitless injector and a Hamilton Bonaduz (Bonaduz Switzerland) HB-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm; film thickness 0.25 µm). The composition of essential oil was expressed in the form of percentages of total peak area as recorded by GC-FID. The GC analysis was performed three times. The medium percentage of peaks are processed and showed in the results section.

Identification of oil constituents

The initial identification of the individual components of the essential oil was carried out by comparison with previously reported values of retention indices (RI), obtained by co-injection of oil samples and C₉–C₃₀ linear hydrocarbons and calculated according to the equation of Van den Dool and Kratz¹⁸. Subsequently, the MS acquired for each component was matched with those stored in the mass spectral library of the

GC–MS system (MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition) and with other published mass spectral data.¹⁹

Maintenance of *A. aegypti*

A colony of *A. aegypti* was maintained in the laboratory at 28 ± 1 °C, $70 \pm 5\%$ relative humidity and a photoperiod of 14L:10D. Adult mosquitoes were maintained on a 10% sucrose solution, while females were blood-fed on pigeons. Larvae were reared in plastic dishes and fed on a diet of minced commercial cat food (Whiskas®).

Assay of larvicidal activity

Stock solutions (containing 100 ppm) of essential oils were prepared by diluting 5.00 mg of oil in 3 drops of Tween®80 and completing to 50 mL with distilled water. This stock was used to prepare adequate concentrations (10, 50 and 100 ppm) of larvicidal bioassays. Larvicidal activities were evaluated using a modified version²⁰ of the method recommended by the World Health Organization²¹. Early4th instar *A. aegypti* were transferred to disposable cups (20 larvae per cup) containing test samples in a range of concentrations obtained (where appropriate) by dilution of stock solutions with distilled water. Three replicate assays were carried out for every test sample at each concentration, and negative controls (distilled water containing the same amount of co-solvent, where appropriate, as the test sample) were included in each assay. Larval mortality, assessed as lack of response to stimulus or larvae not rising to the surface, was determined after 24 and 48 h, and median lethal concentration (LC₅₀) values were calculated by Probit analysis using StatPlus2008 software.

Results and discussion

A total of 41 compounds were identified, accounting for 89.3% of the total composition of the leaves of *Eugenia brejoensis*, Table 1.

Table 1 Identification of constituents of the essential oils obtained from *Eugenia brejoensis* leaves.

Number	Identify Compound ^a	Retention Indices		Content (as % of total oil)
		Determined ^b	Literature ^c	
1	α -Cubebene	1351	1348	0.25
2	α -Copaene	1377	1374	0.79
3	β -Elemene	1393	1389	1.22
4	α -Gurjunene	1411	1409	2.83
5	β -(E)-Caryophyllene	1421	1417	14.4
6	β -Copaene	1431	1430	0.36
8	β -Gurjunene	1434	1431	0.05
10	Aromadendrene	1441	1439	1.2
11	<i>trans</i> -Muurolo-3,5-diene	1452	1451	0.11
12	α -Humulene	1455	1452	1.5
14	Caryophyllene <9-epi-(E)->	1463	1464	2.33
15	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-diene	1475	1475	0.1
16	γ -Muurolene	1478	1478	1.14
17	β -Selinene	1490	1489	0.34
18	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-diene	1494	1493	0.02
19	Bicyclogermacrene	1502	1500	7.93
20	γ -Cadinene	1516	1513	5.94
21	δ -Cadinene	1526	1522	22.6
22	<i>trans</i> -Cadina-1,4-diene	1534	1533	0.63
23	α -Cadinene	1540	1537	1.06
24	α -Calacorene	1545	1544	0.19
26	Palustrol	1570	1567	0.13
27	Spathulenol	1580	1577	3.28
28	Viridiflorol	1594	1592	0.08
29	Guaiol	1600	1600	1.61
31	Cubenol <1,10-di-epi->	1618	1618	0.31
33	Cubenol <1-epi->	1631	1627	0.92
34	α -Muurolol	1644	1644	9.34
35	α -Cadinol	1657	1652	8.49
36	Bulnesol	1670	1670	0.08
41	Shyobunol	1693	1688	0.07
Sesquiterpenes hydrocarbons				62.66
Oxygenated sesquiterpenes				26.64
Unidentified compounds				9.92
Total				99.22

^a Constituents listed in order of elution on a non-polar DB-5 column; ^b Retention indices (RI) calculated from retention times in relation to those of a series of C₉-C₃₀*n*-alkanes on a 30 m DB-5 capillary column; ^c Values taken from Adams, 2007; –: Not detected

The majors' components of essential oil of *Eugenia brejoensis* leaf belong to sesquiterpenes (62.66%) and oxygenated sesquiterpenes (26.64%). The major constituents were δ -Cadinene (22.6%), β -Caryophyllene (14.4%), α -Muurolol (9.34%) and α -Cadinol (8.49%) and Bicyclogermacrene (7.93%). A number of 5 unidentified compounds were found, accounting 9.92% of the total component.

Previous research of the essential oil of the *Eugenia* genus has brought light some similarities between members of the genus. Monoterpenoids such as α and β -Pinene and sesquiterpenoids such as β -Caryophyllene are the most abundant in many of the essential oil of the *Eugenia* species.²²

Essential oils of leaves of Myrtaceae species revealed the constant presence β -Caryophyllene as a one of the majors components in the essential oil, as describes to *Neofabricia mirtifolia*, *Eugenia dysenterica*, *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia caryophyllus*^{23–28}. Previous works studied the essential oil composition of three species of *Eugenia* (*E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* and *E. umbelliflora*) and identified that α and β -Pinene, β -Caryophyllene, Bicyclogermacrene, and δ -Cadinene are present in medium quantity (<2.5%), although Viridiflorol and Spathulenol are majors components to two of than species. The essential oil of eight samples of *E. protenta* leaves collected in Pará/Brazil showed a large quantity of Germacrene, Bicyclogermacrene, δ -Cadinene and β -Caryophyllene to samples F (15.1%; 11.8%, 5.8%, 5.1%), G (11.5%; 1.4%, 15.4%, 7.9%) and H (15.6%; 6.8%, 8.5%, 5.7%). The Sample E showed Bicyclogermacrene, δ -Cadinene and β -Caryophyllene as a large quantity too but in the composition of samples A, B, C and D the quantity of these compounds were not significant, these samples are collected in the same region but in different seasons and in the in the countryside. The conditions of the soil and climate of the forest may explain these similarities because samples E, F and G were collected in the Marieta Beach and sample H was collected in Algodual, both places are near to the cost and it is possible to present an ambient close to Mata Atlântica forest in Recife, place that we collected our *Eugenia brejoensis*. The samples E – H were collected in different forests but this chemotypes are more similar to chemotype collected in Recife and identified in this work.²⁹ This description corroborate our essential oil identification data to *Eugenia brejoensis*, an endemic plant in Pernambuco, Brasil.

Table 2 Activities against fourth stage larvae of *Aedes aegypti* of the essential oil of *Eugenia brejoensis*

Extract	LC ₅₀ (confidence interval) ^a	Standard error
Essential oil	214.7 ppm (190.5 – 238.9)	± 12.3

^aMedian lethal concentration values (LC₅₀) and 95% confidence intervals are means of three replicate determinations.

The essential oil of *Eugenia brejoensis* leaf showed a moderate larvicidal activity against *A. aegypti* mosquito. The mortality of *A. aegypti* larvae was observed above 100 ppm of the oil. The oil is responsible to kill 50% of the mosquito larvae between range concentrations of 160 – 280 ppm, LC₅₀ = 214,7 ± 12,3 ppm. Above 180 ppm the larvae mortality increases until 100%. There is not data of larvicidal activity to δ -Cadinene and Bicyclogermacrene in the literature but this activity was investigated to β -Caryophyllene to four authors and the CL₅₀ ranged between >50 ppm to 1,202 ppm.³⁰ The mosquito strains with varying degrees of resistant can be explain this variation. Santos *et al*³¹ verified that β -Caryophyllene gives a small contribution in the larvicidal activity (150 – 400 ppm, mortality < 10 ppm) and in this case the high percentage of β -Caryophyllene (11.30%) in the essential oil suggests that another component of the oil is responsible to larvicidal effect observed.

Other species of the genus have been studied for their larvicidal activity. In Brazil, the leaves of *E. uniflora* L. are crushed and spread for its flavour and fly-repellent property.³² Also, the extracts of *E. uniflora* leaves presented larvicidal effect with 65% of mortality for the ethanolic extract of 500 ppm.³³ In further work, the leaf methanol extract was therefore investigated to determine the most active subfraction.³⁴ Leaf extracts with different solvents of *E. jambolana* showed LC₅₀ in the range of 40-400 ppm for *A. aegypti* and others species of mosquitos.³⁵ In a different study extracts of *E. jambolana* exhibited synergistic effect against *A. aegypti* when applied with deltamethrin.³⁶ The aqueous extract of flower buds of *E. caryophyllata* (clove) was study by Medeiros *et al* and reported for LC₅₀ of 6.4 mg/mL after 24h of exposure of the larvae in 4th instar³⁷ and LC₅₀ of 23.2 ppm for 48h of exposure for the 3rd instar of the larvae.³⁸

The essential oil of species of the genus were also evaluated for activity against *A. aegypti*. For the species *E. triquetra* the LC₅₀ value of 64.8 ppm was found for the leaf oil containing as main components monoterpenes such as linalool (17.5%), limonene (16.9%), α -pinene (11.6%) and β -pinene (8.7%).³⁹ The oil of leaves of *E. melanadenia* showed LC₅₀ value of 85 ppm and its major component was 1,8-cineol (> 45% of the oil).⁴⁰ The essential oil of *E. uniflora* showed embryotoxicity on *A. aegypti* larvae with a viability inhibition of 100% in the tested concentrations (0.2; 0.4 and 0.8 ppm).⁴¹

Essential oil of *Eugenia* species were reported to present many biological activities^{42–44} and the identification of the components of a new source of essential oil could lead to discovery of new bioactive compounds.

Acknowledgments

The authors acknowledge NANOBIOTEC-Brasil/CAPES, PPSUS/FACEPE, PRONEX-2008/FACEPE and INCTDengue/CNPq for financial support and Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for authorizing collections in Parque Nacional do Catimbau.

References

- ADDIN Mendeley Bibliography CSL_BIBLIOGRAPHY (1) Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B. K.; Landrum, L.; Matsumoto, K.; Mazine, F. F.; Lughadha, E. N.; Proença, C.; Silva, L. H. S.; Wilson, P.; Lucas, E. World Checklist of Myrtaceae <http://apps.kew.org/wcsp/>.
- (2) Wilson, P. G.; O'Brien, M. M.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J. *Am. J. Botany* **2001**, *88*, 2013–2025.
- (3) Merwe, M. M. Van Der; Wyk, a. E. Van; Botha, a. M. *Plant Systematics and Evolution* **2004**, *251*, 21–34.
- (4) Oliveira, A. L.; Lopes, R. B.; Cabral, F. a.; Eberlin, M. N. *Food Chemistry* **2006**, *99*, 1–5.
- (5) Landrum, L. R.; Kawasaki, M. *Brittonia* **1997**, *49*, 508–536.
- (6) Cardoso, C. M. V.; Sajo, M. das G. *Acta Botanica Brasilica* **2006**, *20*, 657–669.

- (7) Ramos, M. F. D. S.; Monteiro, S. D. S.; da Silva, V. P.; Nakamura, M. J.; Siani, A. C. *Journal of Essential Oil Research***2010**, 22, 109–113.
- (8) Lee, M.; Nishimoto, S.; Yang, L.; Yen, K.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Okuda, T. *Phytochemistry***1997**, 44, 1343–1349.
- (9) Hussein, S. a. M.; Hashem, A. N. M.; Seliem, M. a.; Lindequist, U.; Nawwar, M. a. M. *Phytochemistry***2003**, 64, 883–889.
- (10) Consolini, a E.; Baldini, O. a; Amat, a G. *Journal of ethnopharmacology***1999**, 66, 33–9.
- (11) Ogunwande, I.; Olawore, N.; Ekundayo, O.; Walker, T.; Schmidt, J.; Setzer, W. *International Journal of Aromatherapy***2005**, 15, 147–152.
- (12) Kanazawa, A.; Patin, A.; Greene, A. E. *Journal of Natural Products***2000**, 63, 1292–1294.
- (13) Lima, T. B.; Silva, O. N.; Silva, L. P.; Rocha, T. L.; Grossi-de-Sá, M. F.; Franco, O. L.; Leonardecz, E. *Evidence-based complementary and alternative medicine***2011**, 2011.
- (14) Timbola, a K.; Szpoganicz, B.; Branco, a; Monache, F. D.; Pizzolatti, M. G. *Fitoterapia***2002**, 73, 174–6.
- (15) De Moraes, S. M.; Craveiro, A. A.; Machado, M. I. L.; Alencar, J. W.; Matos, F. J. A. *Journal of Essential Oil Research***1996**, 8, 449–451.
- (16) Mazine, F. F.; Souza, V. C. *Botanical Journal of the Linnean Society***2008**, 158, 775–777.
- (17) Azevedo, P. de; Silva, L.; Silva, A.; Macedo, A.; Araujo, J.; Silva, M. *Scientia Plena***2012**, 8.
- (18) Van Den Dool, H.; Dec. Kratz, P. *Journal of Chromatography A***1963**, 11, 463–471.
- (19) Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, 2009.
- (20) Autran, E. S.; Neves, I. a; da Silva, C. S. B.; Santos, G. K. N.; da Câmara, C. a G.; Navarro, D. M. a F. *Bioresource technology***2009**, 100, 2284–8.
- (21) OMS WHO/VBC/81**1981**, 807, 1–6.
- (22) Cole, R. a.; Haber, W. a.; Setzer, W. N. *Biochemical Systematics and Ecology***2007**, 35, 877–886.

- (23) Brophy, J. J.; Clarkson, J. R. *Biochemical Systematics and Ecology***1992**, 20, 689–696.
- (24) Brophy, J. J.; Clarkson, J. R.; Cravens, I. L. Y. N. A.; Forrester, R. I. *Biochemical Systematics and Ecology***1994**, 22, 409–417.
- (25) Costa, T. R.; Fernandes, O. F.; Santos, S. C.; Oliveira, C. M.; Lião, L. M.; Ferri, P. H.; Paula, J. R.; Ferreira, H. D.; Sales, B. H.; Silva M do, R. *Journal of ethnopharmacology***2000**, 72, 111–7.
- (26) Fichi, G.; Flamini, G.; Giovanelli, F.; Otranto, D.; Perrucci, S. *Experimental parasitology***2007**, 115, 168–172.
- (27) Jirovetz, L. E.; Uchbauer, G. E. B.; Toilova, I. V. S.; Toyanova, A. L. S.; Rastanov, A. L. K.; Chmidt, E. R. S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***2006**, 54, 6303–6307.
- (28) Magina, M. D. a; Dalmarco, E. M.; Wisniewski, A.; Simionatto, E. L.; Dalmarco, J. B.; Pizzolatti, M. G.; Brighente, I. M. C. *Journal of Natural Medicines***2009**, 63, 345–50.
- (29) Zoghbi, M. G. B.; Guilhon, G. M. S. P.; Sarges, F. N.; Pereira, R. a.; Oliveira, J. *Biochemical Systematics and Ecology***2011**, 39, 660–665.
- (30) Navarro, D. M. A. F.; Bezerra-Silva, P.; Silva, M. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier (in press): India, 2013.
- (31) Santos, G. K. N.; Dutra, K. A.; Barros, R. A.; da Câmara, C. A. G.; Lira, D. D.; Gusmão, N. B.; Navarro, D. M. A. F. *Industrial Crops and Products***2012**, 40, 254–260.
- (32) Morton, J. F. In *Fruits of Warm Climates*; Florida Flair Books: Miami, FL, 1987; pp. 386–388.
- (33) De S. Luna, J.; dos Santos, A. F.; de Lima, M. R. F.; de Omena, M. C.; de Mendonça, F. A. C.; Bieber, L. W.; Sant’Ana, A. E. G. *Journal of Ethnopharmacology***2005**, 97, 199–206.
- (34) Famuyiwa, F. G.; Adebajo, A. C.; Aladesanmi, J. A. *Planta Med***2011**, 77, PM183.
- (35) Raghavendra, B. S.; Prathibha, K. P.; Vijayan, V. A. *Journal of Entomology***2011**, 8, 491–496.
- (36) Raghavendra, B. S.; Prathibha, K. P.; Vijayan, V. A. *Environmental Science and Pollution Research***2013**, 20, 3830–3835.
- (37) Medeiros, E. da S.; Rodrigues, I. B.; Litaiff-Abreu, E.; Pinto, A. C. da S.; Tadei, W. P. *African Journal of Biotechnology***2013**, 12, 836–840.

- (38) ES, M.; FM, C.; IB, R.; WP, T. *Journal of Research in Biology***2011**, 1, 518–523.
- (39) FD, M.; JL, A.; LB, R.; Ramírez, R.; Usubillaga, A.; Segnini, S.; Carmona, J.; Silva, B. *Nat Prod Commun***2010**, 5, 965–968.
- (40) Aguilera, L.; Navarro, A.; Tacaronte, J. E.; Leyva, M.; Marquetti, M. C. *Revista Cubana de Medicina Tropical***2003**, 55, 100–104.
- (41) Leite, A. M.; Lima, E. de O.; Souza, E. L. de; Diniz, M. de F. F. M.; Leite, S. P.; Xavier, A. L.; Medeiros, I. A. de *Revista Brasileira de Farmacognosia***2009**, 19, 842–846.
- (42) Singh, J.; Baghotia, A.; Goel, S. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences***2012**, 3, 1469–1475.
- (43) Chaieb, K.; Hajlaoui, H.; Zmantar, T.; Kahla-Nakbi, A. Ben; Rouabhia, M.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. *Phytotherapy research : PTR***2007**, 21, 501–6.
- (44) Lago, J. H. G.; Souza, E. D.; Mariane, B.; Pascon, R.; Vallim, M. A.; Martins, R. C. C.; Baroli, A. A.; Carvalho, B. A.; Soares, M. G.; dos Santos, R. T.; Sartorelli, P. *Molecules (Basel, Switzerland)***2011**, 16, 9827–37.

8.APENDICES

Apêndice 1 – Questionário Prévio à Coleta de Sêmen.

QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE SÊMEN

Nome: _____ Idade: _____

Estado Civil: _____ Número de Filhos: _____

1. Quantos dias de abstinência sexual (sem relações sexuais ou masturbação) _____
2. Qual a frequência média de relações sexuais? _____
3. Faz uso de bebida alcoólica? (☐) Sim (☐) Não
4. É fumante? (☐) Sim (☐) Não
5. Doenças anteriores? (Caxumba, Hérnia, Diabetes, Varicocele, Hipertensão, Infecção Urinária de repetição, outras)
Especificar: _____
6. Está em uso de medicamentos? (☐) Sim Quais? _____
Há quanto tempo _____ (☐) Não
7. Já fez algum espermograma anteriormente? (☐) Sim Quando? _____
(☐) Não

Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre Esclarecido.**Associação Caruaruense de Ensino Superior**Av. Portugal, 584 | Bairro Universitário | Caruaru – PE | CEP 55.016-901 | Fone: 81.2103.2000 | Fax: 81.2103.2053
asc@asc.edu.br – www.asc.edu.br | CNPJ: 09993940/0001-01**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, _____, concordo em fazer a doação de sêmen para o desenvolvimento da pesquisa **“Avaliação Da Atividade Espermicida de Plantas Da Caatinga”**. Declaro que fui informado que esta pesquisa tem por objetivo analisar o efeito de plantas endêmicas da caatinga sobre a viabilidade e motilidade de espermatozóides humanos, estando ciente que apenas serei incluído nesta, após leitura e assinatura deste termo e que meus resultados poderão ser divulgados através de artigos, revistas e eventos científicos.

Pelo presente consentimento, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, dos objetivos do presente Projeto de Pesquisa, e que concordo em participar do mesmo. Tenho conhecimento de que receberei resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos e outros assuntos relacionados à pesquisa; terei total liberdade para retirar meu consentimento, e em qualquer momento, deixar de participar do mesmo. É considerado um risco mínimo relacionado ao constrangimento, uma vez que não serão adotados procedimentos invasivos. Os benefícios relacionados com sua aceitação é avaliar a possível ação espermicida de plantas medicinais que poderiam ser utilizadas na produção de um contraceptivo.

Fui informado que caso concorde em participar da pesquisa meu nome não será divulgado e que manterá o caráter confidencial das informações registradas relacionadas com minha privacidade.

Caruaru, ____/____/____.

Assinatura do participante: _____

Se tiver dúvidas sobre o estudo contatar os pesquisadores responsáveis:

Prof. Msc.: Luis Cláudio Nascimento da Silva ou

Prof. Msc.: Risonildo Pereira Cordeiro, no telefone 2103.2000.

Comissão de Ética em Pesquisa

Faculdade **ASCES**: Avenida Portugal, 584, Bairro Universitário- Caruaru/PE - CEP: 55016-400. Fone: (81) 2103.2090

Luis Cláudio Nascimento da Silva

Risonildo Pereira Cordeiro