

Constituintes químicos e potencial citotóxico do óleo essencial de *Xylopi* *laevigata* em células de carcinoma hepatocelular - HepG2

Simony Marques da Silva Gandine¹, Francisco de Paula Careta², Elaine Gimenez Guimarães¹, Karla Maria Pedra de Abreu¹, Luciano Menini¹

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo – Campus de Alegre. Rod. BR 482, Km 47, s/n – distrito de Rive, Alegre - ES, 29500-000. ²Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto Universitário, s/n, Caixa Postal 16, CEP. 29500-000, Alegre, ES-Brasil. Autor para correspondência: lmenini@ifes.edu.br

RESUMO: *Xylopi* *laevigata*, conhecida como pindaíba ou meiú, é uma espécie nativa da Mata Atlântica e popularmente aplicada como planta medicinal em algumas regiões do país. O óleo essencial extraído das folhas dessa planta foi caracterizado afim de determinar a sua composição química e a potencialidade citotóxica do óleo essencial frente a linhagem HepG2 de carcinoma hepatocelular (câncer de fígado) foi avaliada. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e os componentes identificados por cromatografia gasosa com detector DIC e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os componentes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *Xylopi* *laevigata* foram: biciclogermacreno, β-cariofileno, germacreno D, espatulenol e α-amorfeno. Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o ensaio de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), que verifica o potencial redox celular. Nas concentrações 62,5 µg/ml a 250 µg/ml ocorreu a inibição em 100% das células de carcinoma hepatocelular. Tais resultados direcionam a estudos fitoquímicos posteriores a fim de validar o seu potencial citotóxico e suas possíveis aplicações na atividade antitumoral.

Palavras-chave: Potencial citotóxico, Produtos Naturais, Óleos Essenciais, Atividade Antitumoral.

ABSTRACT: *Chemical constituents and cytotoxic potential of essential oil Xylopi laevigata in hepatocellular carcinoma cells - HepG2.* The *Xylopi laevigata*, known as pindaíba or meiú, is a native plant of the Atlantic Forest and popularly applied as a medicinal plant in some regions of the country. The essential oil extracted from the leaves of this plant was characterized in order to determine their chemical composition and evaluated the cytotoxic potential of the essential oil, the front line HepG2 hepatocellular carcinoma (liver cancer). The essential oil was extracted by hydrodistillation and components identified by gas chromatography with FID detector and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The major identified compounds were bicyclogermacrene, β-caryophyllene, Germacrene-D, spatulenol and α-amorfene. To assess cell viability was used XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide), which checks the cellular redox potential. All concentrations 62.5 mg/ml to 250 mg/ml, the inhibition occurred in 100 % cells of hepatocellular carcinoma. These results direct the subsequent phytochemical studies to confirm their cytotoxic potential and their possible applications in antitumor activity.

Key words: Cytotoxic potential, Natural Products, Essential Oils, Antitumor Activity

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que atinge milhões de pessoas no mundo, com elevado índice de mortalidade. Embora nas últimas décadas os avanços na produção de novas drogas e da medicina tenham conseguido fazer progressos no tratamento, existem tumores de difícil destruição,

fazendo-se necessário a descoberta de novos fármacos antineoplásicos, visando um tratamento com efeitos colaterais insignificantes. Sendo a busca por substâncias citotóxicas e potencialmente anticancerígenas uma das prioridades da química medicinal (Mans et al. 2000).

Diferentes abordagens vêm sendo

utilizadas nesta busca, incluindo os produtos naturais, uma vez que os mesmos desempenham fundamental importância no desenvolvimento de novos fármacos (Pisco et al. 2006). Dentre estes, os óleos essenciais (OEs) tem despertado grande interesse nas pesquisas e na indústria farmacêutica. A complexidade da composição química dos OEs, demonstram variadas atividades farmacológicas, dentre elas a inibição do crescimento celular, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bakkali et al. 2008; Bagetta et al. 2010).

Muitas espécies vegetais possuem poucos estudos quanto às suas potencialidades farmacológicas, portanto, óleos essenciais destas espécies com composição química variada são promissores, no ponto de vista farmacológico, na busca por alternativas mais ativas contra o câncer e menos tóxicas para o organismo.

Recentemente, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de isolar compostos encontrados exclusivamente em espécies da família Annonaceae e que possuam atividade biológica comprovada, tais como: citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária, antimicrobiana e inibidoras do Complexo I mitocondrial (Gonzalez et al. 1997; Matsumoto et al. 2010; Lima et al. 2010).

Pertencente à família Annonaceae, o gênero *Xylopi* L. compreende cerca de 150 espécies de arbustos e árvores aromáticas. A espécie *Xylopi laevigata* (Mart.) RE Fries, popularmente conhecida como “ pindaíba “ ou “ meiú “ é uma arvoreta amplamente encontrada em áreas de remanescentes de Mata Atlântica (Maas et al. 2011), de origem endêmica e distribuída geograficamente em toda região brasileira (Maas et al. 2015).

Assim, reconhecendo o potencial farmacológico da Família Annonaceae e a grande variedade do gênero *Xylopi*, o objetivo dos nossos estudos foi analisar a composição química e a potencialidade citotóxica dos óleos essenciais de *Xylopi laevigata* frente a linhagem HepG2 de carcinoma hepatocelular (câncer de fígado).

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As partes aéreas da espécie vegetal *Xylopi laevigata* foram coletadas no mês de junho de 2015, no período matutino em um Fragmento Florestal do Polo de Educação Ambiental (“243134,812” S, “7702042,482” W) do IFES - Campus de Alegre (PEAMA/IFES), localizado no distrito de Rive, município de Alegre, região Sul do Espírito Santo, Brasil. A planta foi identificada pela Bióloga/botânica Dr. Karla Pedra de Abreu (42.180/02) e depositada no herbário da Universidade Federal do Espírito

Santo-(VIES) – Subcuradoria Jerônimo Monteiro - ES aos cuidados do coletor JPFZ 45 responsável pelo processo de registro, em andamento.

Determinação da biomassa

Para o cálculo do rendimento do óleo essencial determinou-se a biomassa das folhas das plantas secas. Na secagem, as folhas foram acomodadas em um tabuleiro e posteriormente, foram deixadas em estufa de circulação a 40 °C até a massa constante. Em seguida foram pesadas em frações de aproximadamente 40 g e envasadas em sacos plástico e armazenadas em freezer com temperatura inferior a 0 °C para posterior extração do óleo essencial.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação seguindo a metodologia adaptada descrita por Craveiro (1981). Em um balão de fundo redondo de 0,5 l foram adicionados aproximadamente 40 g da folha da planta seca e triturada e 300 ml de água destilada. O balão foi acoplado a um aparelho do tipo Clevenger modificado e a hidrodestilação foi realizada por 6 h, após o início da ebulição da água. O óleo essencial foi coletado e separado do meio aquoso por centrifugação, transferido para um eppendorf e guardado em freezer a temperatura de 0 °C.

Caracterização química

As amostras do óleo essencial foram analisadas em triplicata por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) (aparelho Shimadzu GC-2010 Plus) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (aparelho Shimadzu GCMS-2010). As amostras do óleo essencial em ambas as análises foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária DB5 (0,25 µm de espessura do filme); N₂ (em análises de CG-DIC) ou He (em análises de CG-EM) como gás de arraste. As análises por CG-EM foram realizadas em um equipamento operando por impacto eletrônico com energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/segundo e fragmentos detectados de 29 a 400 (*m/z*). A identificação dos componentes foi realizada pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroscopia Willey7, NIST05, NIST05s, com a co-injeção de padrões puros de componentes do óleo essencial e pelos índices de Kovats (IK) (Para o cálculo do IK, foi utilizada uma mistura homóloga de alcanos lineares (C₇ a C₄₀) e o valor calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura (Adams, 2007).

Teste da atividade citotóxica

A linhagem HepG2 de carcinoma hepatocelular utilizada neste estudo, foi cultivada em meio *dulbecco'smodifiedeagle* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, em frascos de cultura de 75 cm², incubados a 5% m/m de CO₂, a 95% de umidade, a 37 °C, até alcançarem confluência acima 80%. Atingida a confluência ideal, as células foram lavadas três vezes com solução salina tamponante (PBS) e tripsinizadas em solução de tripsina 0,05% m/v. Posteriormente, as células foram contabilizadas com o auxílio da câmara de Neubauer, seguido por cálculos de concentração e plaqueamento.

As células HepG2 foram inicialmente cultivadas na concentração de 7,5 x 10⁵ células/poço em placas de 96 poços, na concentração final de 200 µl/poço a 37 °C e 5% de CO₂. O óleo essencial de *X. laevigata* foi adicionado em triplicata nas concentrações crescentes de 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125,0 e 250,0 µg/ml por 48 horas. Após esse período, os poços foram lavados 3 vezes com solução salina e foram adicionados 100 µl de XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H tetrazolium hydroxide) (ThermoFisher Scientific) (1 mg/ml). A placa foi analisada em leitora de microplaca (THERMOPLATE – TP-READER) nos comprimentos de onda de 450 nm e 630 nm. O fármaco 5-Fluorouracil foi utilizado como controle positivo e o DMSO como controle negativo.

Em seguida, o experimento foi incubado por 48 h e após atingido o tempo de incubação, os poços foram lavados três vezes com PBS, seguido da adição 100 µl de meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) sem fenol red, com posterior adição de 50 µl de solução composta por XTT diluído em RPMI e metassulfato de fenazina (PMS). O experimento foi incubado por 2 h, seguido de leitura nos comprimentos de onda de 450 nm e 500 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial obtido a partir das folhas de *Xylopi laevigata* por meio de extração por hidrodestilação apresentou uma coloração clara esverdeada e o rendimento médio do óleo foi de 0,66% (m/m).

Composição química do óleo essencial

As amostras do óleo essencial de *Xylopi laevigata* foram analisadas por cromatografia para determinação da sua composição química. Para a análise dos constituintes presentes no óleo foram considerados somente os compostos com área relativa do pico superior a 1%. A identificação dos

constituintes do óleo foi realizada por CG-DIC aplicando o cálculo do índice de Kovats (IK) e comparando com dados descritos por Adams (2007). Além da identificação pelo IK, foi realizada a análise do óleo essencial por CG-EM e a composição química foi determinada pela comparação dos espectros de massas das substâncias presentes no óleo com dados das espectroscopia Willey7, NIST05, NIST05s. Havendo conformidade das informações obtidas pelo cálculo do IK e de espectrometria de massas chegamos a composição do óleo essencial de *Xylopi laevigata* apresentado na Tabela 1.

Foram observadas nas análises por cromatografia gasosa a presença de 28 compostos diferentes no óleo essencial, dos quais 21 deles foram identificados pela análise combinada do valor do IK e dados das bibliotecas de espectrometria de massas. A soma do teor dos 21 constituintes identificados no óleo essencial correspondeu a 81,5% do total na amostra, sendo que os componentes majoritários presentes no óleo essencial foram o biciclogermacreno (16,5%), β-cariofileno (11,2%), (D)-germacreno (8,8%), espatulenol (7,7%) e α-amorfeno (6,5%). Segundo Costa, (2012) o α-pineno, biciclogermacreno, (D)-germacreno, espatulenol e (E)-cariofileno foram identificados em diversos óleos essenciais de espécies de *Annona*, indicando que os mesmos podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero, e da família Annonaceae.

Em um estudo da composição química do óleo essencial de espécimes *X. laevigata* realizado por Quintans J.S. et al. (2013), algumas dessas substâncias foram identificadas como os principais constituintes dos óleos em todas as amostras analisadas, como: γ-muuroleno (0,60-17,99%), δ-cadineno (13,45%), (B)-germacreno (7,31%), α-copaeno (5,98%), (D)-germacreno (44%), biciclogermacreno (14,63%) e (E)-cariofileno (5,43-7,98%). Câmara et al (2007) em estudo com a espécie *Xylopi sericea*, revelou a presença de componentes também encontrados em menor concentração na *Xylopi laevigata* como α- e β-pineno, mirceno e copaeno.

Queiroz et al. (2014) identificou 36 compostos, na espécie *X. laevigata* que mostrou uma predominância de sesquiterpenos (91,30%), como: γ- muuroleno (17,78%), δ-cadineno (12,23 %), biciclogermacreno (7,77%), α-copaeno (7,17%), (D)-germacreno (6,54%), cariofileno (5,87%), γ-cadineno (4,72%), aromadendreno (4,66%) e γ-amorfeno (4,39%). Constituintes principais como limoneno (3,36%), α-cubebeno (3,04%), (B)-germacreno (2,86%), espatulenol (2,29%), β-copaeno (1,86%), α-ylangeno (1,26%), α- pineno (1,25%), β-cubebeno (1,20%) e α-muurolol (1,11%) foram relatados por Maia

et. al. (2005), nos óleos essenciais de muitas outras espécies de *Xylopi*a, indicando que esta espécie tem composição química típica da família Annonaceae.

As substâncias óxido de cariofileno, β -cariofileno e espatulenol foram reportadas em óleos essenciais de algumas espécies da família

Annonaceae incluindo o gênero *Xylopi*a, elas são consideradas os constituintes predominantes para esse gênero de Annonaceae (Fechine et.al. 2002; Lima et.al. 2003).

Na Figura 1 está apresentada as estruturas químicas dos 21 compostos identificados nas amostras de óleo essencial analisado.

TABELA 1. Identificação da composição química do óleo essencial das folhas da planta *Xylopi*a *laevigata*^a.

Nome da substância	(%)Área Relativa	TR	IKCal	IKTa ^b	m/z (Intensidade Relativa) ^c
alfa-pineno	1,3	8,496	932	932	136(11); 121(12); 105(10); 93(100); 137(1); 79(22); 77(26); 41(14)
beta-pineno	1,2	10,315	974	974	136 (10); 121(9), 93 (100) ; 91 (26) ; 79 (19) ; 77 (19) ; 69 (28) ; 41 (30)
mirceno	0,6	11,128	991	988	136 (4); 121 (5) ; 93 (100) ; 79 (14) ; 77 (13) ; 69 (67) ; 53 (9) ; 41 (76)
D-limoneno	1,8	12,773	1027	1024	136 (29); 121 (23); 107 (22); 93 (95); 79(34); 68 (100); 53 (20); 41 (19)
elemene	1,2	27,623	1337	1335	204 (3); 189 (4); 161 (34) ; 136 (61); 121 (100) ; 93 (88) ; 55 (11) ; 41 (19)
alfa-cubeneno	0,5	28,172	1349	1345	204 (20); 161 (91) ; 119 (92) ; 105 (100) ; 91 (38) ; 81 (34) ; 55 (17); 41(18)
alfa-copaeno	1,4	29,337	1375	1374	204 (16); 161 (93) ; 119 (100) ; 105 (94) ; 93 (50) ; 81 (30) ; 55 (18) ; 41 (21)
beta-cariofileno	11,2	31,327	1419	1417	204 (9); 133 (87) ; 105 (63) ; 93 (100) ; 91 (82) ; 79 (62) ; 69 (79) ; 41 (70)
aromadendreno	4,0	32,117	1438	1439	204 (39); 161 (95); 133 (72); 119 (69); 105 (88); 91 (100); 79 (70) ; 41 (74)
alfa-humuleno	1,8	32,741	1453	1452	204 (7); 147 (19); 121 (25); 93 (100); 80 (33) ; 67 (12) ; 55 (11) ; 41 (16)
allo-aromadendreno	1,3	33,078	1461	1458	204 (54); 189 (36); 161 (89); 133 (68); 119 (66); 105 (93); 91 (100); 41 (63)
alfa-amorfeno	6,5	33,825	1478	1483	204 (26); 161 (100) ; 133 (33) ; 119 (53) ; 105 (61) ; 91 (49) ; 79 (34) ; 41 (24) ;
D-germacreno	8,8	33,981	1481	1484	204 (17); 161 (100) ; 119 (39) ; 105 (65) ; 93 (27) ; 91 (46) ; 81 (37) ; 41 (23)
biciclogermacreno	16,5	34,669	1496	1500	204 (23); 161 (44) ; 121 (100) ; 107 (57) ; 93 (88) ; 81 (33) ; 79 (40) ; 41 (33)
gama-cadineno	2,8	35,389	1514	1513	204 (22); 161 (100) ; 119 (42) ; 105 (54) ; 91 (40) ; 81 (29) ; 79 (27) ; 41 (21)
delta-cadineno	4,5	35,808	1525	1522	204 (49); 161 (100) ; 134 (56) ; 119 (67) ; 105 (62) ; 91 (37) ; 81 (33) ; 41 (20)
B-germacreno	2,2	37,126	1558	1559	204 (20); 161 (43) ; 121 (100) ; 105 (70) ; 93 (91) ; 81 (57) ; 67 (52) ; 41 (47)
espatulenol	7,1	38,022	1580	1577	220 (6); 159 (65) ; 119 (76) ; 105 (67) ; 91 (89) ; 79 (56) ; 69 (44) ; 43 (100)
NI	5,8	38,234	1585	-	

Continua...

TABELA 1. Continuação

Nome da substância	(%)Área Relativa	TR	IKCal	IKTa ^b	m/z (Intensidade Relativa) ^c
viridiflorol	1,5	38,565	1592	1592	204 (22); 161 (72); 119 (62); 107 (84); 93 (84); 81 (87); 79 (63); 43 (100)
ledol	1,6	39,010	1603	1602	204 (15); 149 (90); 107 (72); 93 (88); 81 (100); 69 (59); 55 (62); 43 (96)
NI	2,3	40,07	1632	-	
alfa-cadinol	3,7	40,461	1642	1652	204 (44); 161 (100); 121 (52); 105 (51); 95 (69); 81 (44); 79 (35); 43 (63)
NI	2,1	40,593	1645	-	
NI	3,4	41,069	1658	-	
NI	1,3	41,675	1673	-	
NI	1,6	44,604	1752	-	
NI	1,0	45,222	1768	-	
Total	99,1				

^aTR (Tempo de Retenção – minutos); IKcal (Índice de Kovats Calculado); IKTab (Índice de Kovats Tabelado) e m/z (relação massa/carga e intensidade relativa).^b Adams, R. P.; 2007. ^cComparado com dados das espectroteca Willey7, NIST05, NIST05s.

A análise do óleo essencial de *Xylopi* *laevigata* mostrou uma predominância de sesquiterpenos e monoterpênicos. Estas classes de compostos são predominantes nos óleos essenciais de plantas e em insetos como agentes de defesa ou feromônio.

Atividade citotóxica

Ensaio de viabilidade (teste de XTT) – análise qualitativa

O óleo essencial das folhas de *Xylopi* *laevigata* teve a ação citotóxica avaliada sobre as linhagens de células de câncer de fígado (HEP-G2), em diferentes concentrações, cujos resultados podem ser observados na Figura 2.

O DMSO por ser utilizado como veículo durante o experimento, foi utilizado como controle negativo e o 5-Fluorouacil (5-FU) foi utilizado como controle positivo.

Nas concentrações 3,9 µg/ml a 15,2 µg/ml da espécie *X. laevigata* ocorre o estímulo da proliferação celular de forma decrescente. Ao analisar a concentração 31,2 µg/ml ocorre o aumento da proliferação celular, possivelmente causado por algum composto que se sobrepôs nesta concentração. Nas concentrações 62,5 µg/ml a 250,0 µg/ml, ocorreu a inibição em 100%, sugerindo que concentrações mais altas da amostra apresentam efeito citotóxico (Gráfico 1).

Os óleos essenciais possuem diferentes mecanismos de ação propostos à atividade

antitumoral, por serem moléculas lipofílicas passam pela membrana citoplasmática das células, afetando a estrutura de suas diferentes camadas e tornando-a permeável, podendo estar relacionada sua toxicidade a danos de membrana (Harzallah et al. 2011; Jaafari et al. 2009).

Estudos mostraram o potencial dos compostos terpênicos presentes em óleo essencial em atividades terapêuticas como: antibacteriano, antifúngico, analgésico, antitumoral e citotóxico (Edris 2007; Mendes et al. 2010). Neves et al (2010) relatam que experimentos comprovam que O β-cariofileno é um sesquiterpeno com atividade anti-inflamatória, citotóxica e antineoplásica com potencial aplicação em fármacos.

Rabêlo (2014), observou em estudos citotóxicos feitos com espécies de Annonaceae, que aquelas em que o β-cariofileno apresentou percentual inferior a 1,06% ou não foi identificado, ocorreu baixa ou nenhuma atividade citotóxica, levando a concluir que isso ocorreu devido, à ausência de maior quantidade destes constituintes.

CONCLUSÃO

A extração e análise do óleo essencial das folhas da espécie *Xylopi* *laevigata* permitiram a quantificação do teor de 28 constituintes do óleo, dos quais 21 foram identificados pela análise conjunta do índice de Kovats e por cromatografia gasosa com detector de massas. Os principais

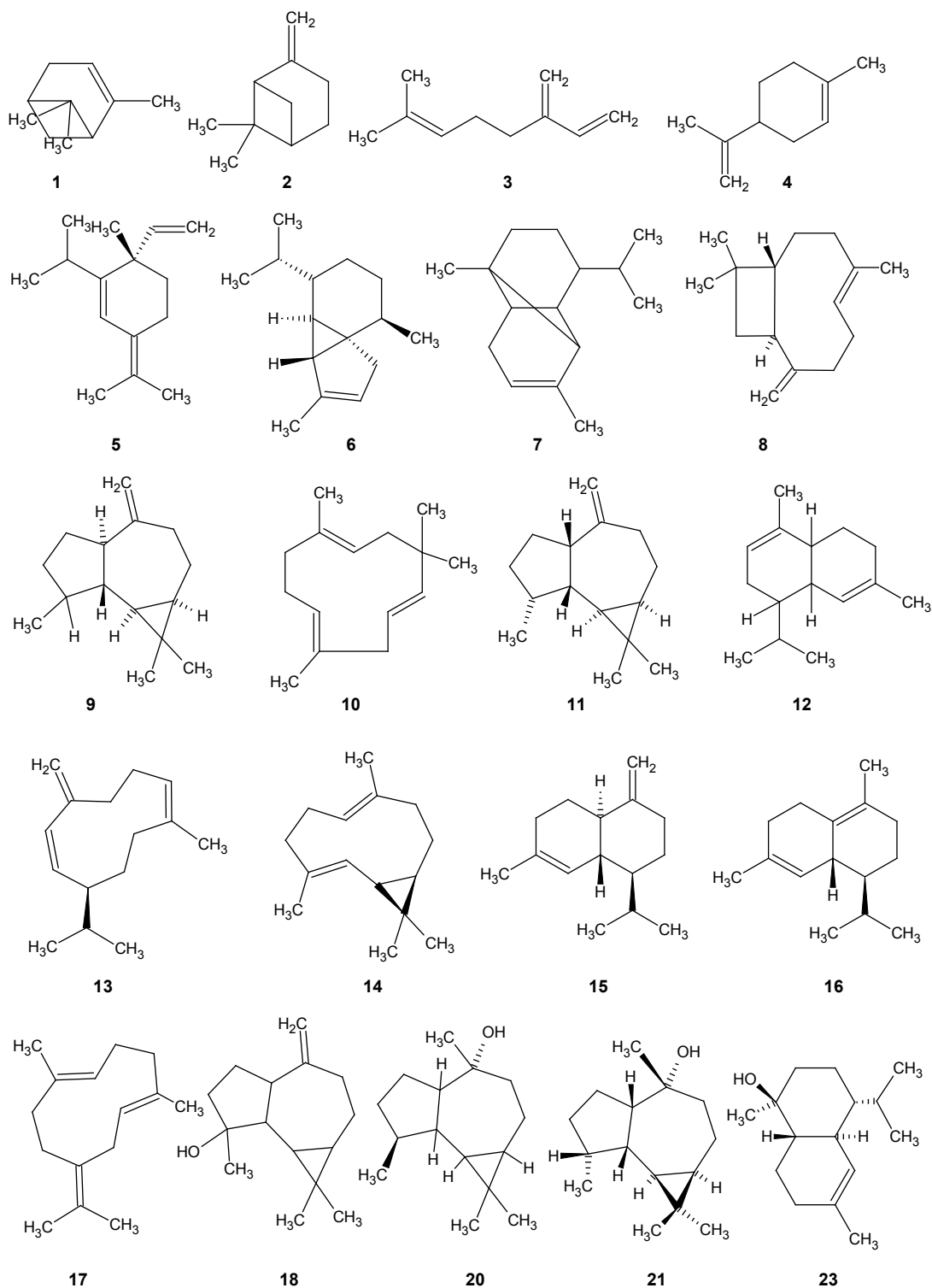


FIGURA 1. Estrutura química dos compostos identificados no óleo essencial de *Xylopia laevigata*. (1) alfa-pineno; (2) beta-pineno; (3) mirceno; (4) D-limoneno; (5) elemeno; (6) alfa-cubeno; (7) alfa-copaeno; (8) beta -cariofileno; (9) aromadendreno; (10) alfa-humuleno; (11) allo-aromadendreno; (12) alfa-amorfoleno; (13) D-germacreno; (14) bicyclogermacreno; (15) gama-cadineno; (16) delta-cadineno; (17) B-germacreno; (18) espatulenol; (20) viridiflorol; (21) ledol; (23) alfa-cadinol.

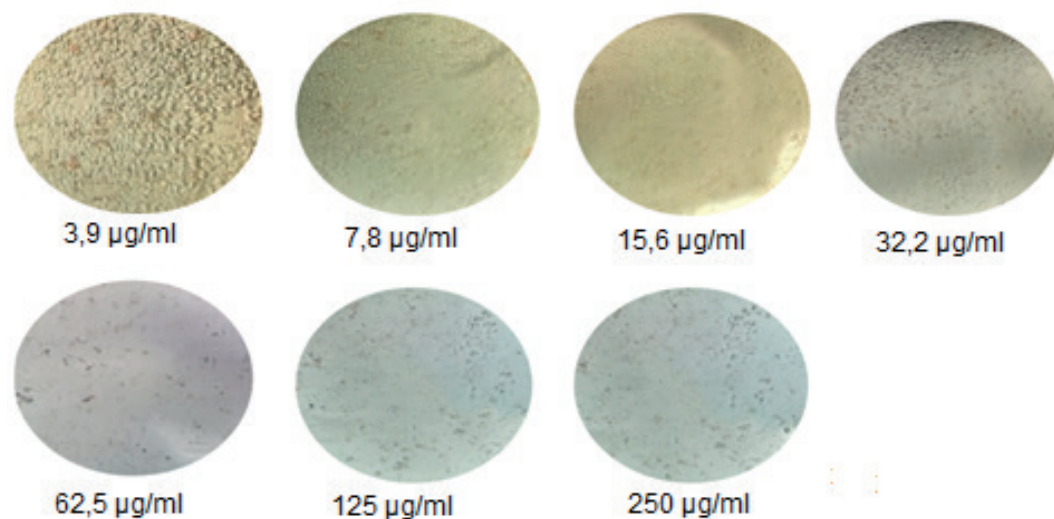


FIGURA 2. Poços após tratamento com XTT. É possível observar a presença das células dentro dos poços.

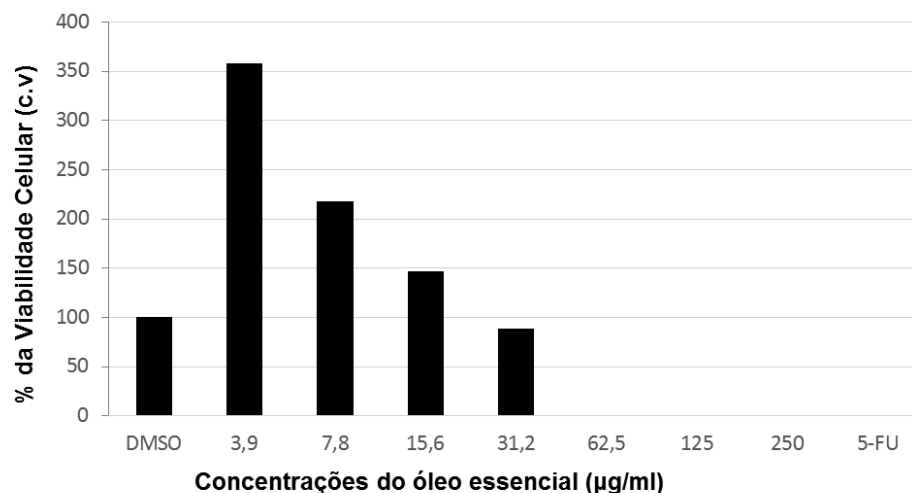


GRAFICO1. Efeito das diferentes concentrações sobre a porcentagem de viabilidade celular de óleo essencial da espécie *X. laevigata* no ensaio de XTT.

componentes identificados no óleo essencial de *Xylopija laevigata* foram o biciclogermacreno, β -cariofileno, (D)-germacreno, espatulenol e α -amorfeno. Nas condições experimentais em questão o rendimento de extração e a presença de compostos de interesse como fármaco botânico indicam a viabilidade de exploração desse óleo essencial

Nas concentrações de 62,5 µg/ml a 250 µg/ml, ocorreu a inibição em 100% das células, sugerindo que concentrações mais altas da amostra podem apresentar efeito citotóxico em de carcinoma hepatocelular - HepG2.

Os resultados obtidos a partir do óleo essencial de *Xylopija laevigata* direcionam a estudos

fitoquímicos posteriores para investigação dos agentes bioativos úteis, para assim, confirmar o seu potencial citotóxico e suas possíveis aplicações da atividade antitumoral. Além disso, a aplicação do óleo dessa espécie pode possibilitar a exploração deste material foliar como fonte de óleo essencial comercial, o que contribuiria para um melhor aproveitamento dessa biomassa vegetal associada a produção de madeira.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e a FAPES pelo suporte financeiro oferecido.

REFERÊNCIAS

- ADAMS RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corp.
- BAGETTA G, MORRONE LA, ROMBOLA L, AMANTEA D, RUSSO R, BERLIOCHI L, SAKURADA S, SAKURADA T, ROTIROTI D, CORASANTI MT (2010) Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.01.013>
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR, M (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- CÂMARA CAG, PONTES WJT, OLIVEIRA JCS, GONDIM MGC, OLIVEIRA, JV, SCHWARTZ MOE (2007) Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiya sericea*. *Quim Nova*. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400015>
- COSTA EV (2012) Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Nat Prod Commun*. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X1200700240>
- CRAVEIRO AA (1981) Óleos essenciais das plantas do Nordeste. Ed. UFC.
- EDRIS AE (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
- FECHINE IV, NAVARRO VR, CUNHA EVL, SILVA MS, MAIA JGS, BARBOSA-FILHO JM (2002) Alkaloids and volatile constituents from *Duquetia flagellaris*. *Biochem Syst Ecol*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00090-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00090-4)
- GONZÁLEZ MC, TORMO J, BERMEJO A, ZAFRA-POLO MC, ESTORNELL E, CORTES D (1997) Rollimembrin, a novel acetogenin inhibitor of mammalian mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett*. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(97\)00171-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(97)00171-6)
- HARZALLAH HJ, KOUIDHI B, FLAMINI G, BAKHROUF A, MAHJOUR T (2011) Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.117>
- JAAFARI MR, BAVARSAD N, BAZZAZ BSF, SAMIEI A, SOROUSH D, CHORBANI S, HERAVI MML, KHAMESIPOUR A (2009) Effect of topical liposomes containing paromomycin sulfate in the course of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Antimicrob Agents Ch*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-08>
- LIMA LARS, PIMENTA LPS, BOAVENTURA MAD (2010) Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.100>
- MANS, DRA, ROCHA AB, SCHWARTSMANN G (2000) Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-3-185>
- MAAS PJM, KAMERHMD, JUNIKKAL, MELLO-SILVARD, RAINER H (2001) Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*. <https://doi.org/10.1590/2175-78602001528005>
- MAAS P, LOBÃO A, RAINER H (2016) Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*.
- MAIA JGS, ANDRADE EHA, DA SILVA ACM, OLIVEIRA J, CARREIRA LMM, ARAÚJO JS (2005) Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopiya* species. *Flavour Fragr J*. <https://doi.org/10.1002/ffj.1499>
- MAGGIO AM, BARONE G, BRUNO M, DUCA D, ROSSELLI SJ (2005) Conformational analysis and DFT calculations of 8a-hydroxy-germacradiene-6,12-olide derivatives. *J Phys Org Chem*. <https://doi.org/10.1002/poc.976>
- MATSUMOTO RS, RIBEIRO JPN, TAKAO LK (2010) Allelopathic potential of leaf extract of *Annona glabra* L. (Annonaceae). *Acta Bot Bras*. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300005>
- MENDES SS, BOMFIM RR, JESUS HCR, ALVES PB, BLANK AF, ESTEVAM CS, ANTONIOLLI AR, THOMAZZI SM (2010) Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.005>
- NEVES A, ROSA S, GONÇALVES J, RUFINO A, JUDAS F, SALGUEIRO L, LOPES MC, CAVALEIRO C, MENDES AF (2010) Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced NFκB activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of α-pinene. *Planta Med*. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186085>
- PISCO L, KORDIAN M, PESEKE K, FEIST H, MICHALIK D, ESTRADA E, CARVALHO J, HAMILTON G, RANDO D, QUINCOCES J (2006) Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. *Eur J Med Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.10.020>
- QUEIROZ, JCC, ANTONIOLLI AR, QUINTANS LJ, BRITO RG, BARRETO RSS, COSTA EV, SILVA TB, PRATA APN, LUCCA JRW, ALMEIDA JRGS, LIMA J, QUINTANS JSS (2014) Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the essential oil from leaves of *xylopiya laevigata* in experimental models. *Sci World J*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/816450>
- QUINTANS JS, SOARES BM, FERRAZ RP, OLIVEIRA AC, DA SILVA TB, MENEZES LR, SAMPAIO MF, PRATA AP, MORAES MO, PESSOA C, ANTONIOLLI AR, COSTA EV, BEZERRA DP (2013) Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopiya laevigata*. *Planta Med*. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1328091>
- RABÊLO SV (2014) Revisão de alcaloides do gênero *Annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). 234p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE.