

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
RODRIGO DAMIAN ANTÔNIO**

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, MORFOANATOMIA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Eucalyptus badjensis* BEUZEV. & WELCH, MYRTACEAE

**CURITIBA
2011**

RODRIGO DAMIAN ANTÔNIO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, MORFOANATOMIA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Eucalyptus badjensis* BEUZEV. & WELCH, MYRTACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Tomoe Nakashima

CURITIBA

2011

Antônio, Rodrigo Damian

Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae / Rodrigo Damian Antônio – Curitiba, 2011.

110 f.: il.; 30 cm

Orientadora: Prof^a. Dra. Tomoe Nakashima

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná,

Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus badjensis*. 2. Fenóis. 3. Antioxidante. 4. Extratos vegetais.
5. CG-EM. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III Título
CDD 583.42

Dedico esta conquista ao meu pai,
Anselmo e à minha mãe, Terezinha:
as maiores influências sobre a minha
personalidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela infinita luz que ilumina minha caminhada por este mundo.

À minha família, pela união e força.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Tomoe Nakashima, pela ternura maternal, confiança e liberdade disposta. Por ter me acolhido e guiado em Curitiba, e pela honra de poder agregar a minha bagagem intelectual, seus conhecimentos e sua cultura.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade e acolhimento.

Ao Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pelo apoio financeiro.

À Embrapa Florestas, pela atenção, pelo auxílio e disponibilidade na coleta do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis, da Universidade do Sul de Santa Catarina, a quem admiro muito, pela grande amizade e por ter me orientado no ingresso ao meio científico.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos conhecimentos oferecidos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, e seus funcionários, pela atenção e agilidade nos serviços oferecidos.

Ao Prof. MSc. João Carlos Possamai, pela amizade e conhecimentos estatísticos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques e ao doutorando Gustavo Frensch, pela colaboração nos ensaios com cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

Ao Prof. Dr. Fabio Murakami, pela acolhida e abertura no laboratório de Controle Biológico para a realização dos testes microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Yedo Alquini, pela paciência e fundamentais conhecimentos em botânica.

Ao Sr. Nilson Belém Filho, do Laboratório de Microtécnica do Departamento de Botânica da UFPR, pela confecção das lâminas permanentes e disponibilização do microscópio fotônico.

À Maria da Graça Teixeira de Toledo, farmacêutica da Central Analítica da UFPR pelo auxílio, simpatia e amizade.

Ao Sr. Jair José de Lima, do Departamento de Nutrição da UFPR, pela liofilização dos extratos.

À mestranda Barbara Moriel, pela amizade e inestimável auxílio nos ensaios microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Railson Henneberger, pelo empréstimo das preciosas micropipetas multicanal.

Ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pelas inúmeras curiosidades esclarecidas.

Ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber, pelos conhecimentos, disponibilidade e auxílio no isolamento de compostos.

Aos colegas orientados pela Prof^a. Dra. Tomoe Nakashima, doutorandos Sayonara Mendes Silva, Prof. Antonio Waldir de Silva e Stella M. Siu Ló e os mes-trandos Paulo César Paraná de Oliveira, Priscila G. Sieben e Ana Carolina Pareja, pelo sentimento de fraternidade.

Aos estagiários: Simone Yae Abe, Camila Itchikawa, Suelen C Nichelle, Mayara Furguim, Shayenne L. Monteiro, Bruna Tonet, Edivaldo P. Duda Jr., Rafael Arcanjo e as alunas da Iniciação Científica Junior Gabrieli R. A. Abreu e Tatiana O. de França, pelo companheirismo e auxílio nos experimentos.

Aos colegas Vinícius Bednarczuk e Francis Zortea, pela amizade formada e pelas risadas entre um experimento e outro.

Aos meus “brothers” Carlos Umberto Cabral, Eriston Paes, André Azambuja, Carlos Alberto e Denilson Maia, pelo misterioso elo de amizade que nos une; irmãos por ideais.

A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização desta vitória.

“Não quero ser escravo do dinheiro nem do medíocre... Quero ser "Escravo" da Vida, da Natureza, do Amor, da Ciência, do Surf e de tudo mais que for digno e humano na Terra; Natural.”

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* possui grande potencial farmacológico. A espécie *Eucalyptus badjensis* está sendo estudada em Santa Catarina e no Paraná, para o seu cultivo na região sul do país, pois apresenta grande resistência a geadas, alta taxa de crescimento e grande potencial para produção de óleos essenciais. Sabendo que a espécie carece de estudos científicos, o objetivo deste trabalho foi investigar a morfoanatomia, composição química e atividades biológicas de *E. badjensis*. O material vegetal foi coletado durante o inverno na Embrapa Florestas, município de Colombo, Paraná. A partir dos métodos usuais de microscopia óptica e eletrônica de varredura, foram evidenciadas cutícula lisa, epiderme uniestratificada, estômatos anomocíticos em ambas as faces, mesofilo isobilateral, cavidades secretoras abaixo da epiderme, cristais de oxalato de cálcio, sistema vascular bicolateral em arco aberto, nervura central com contorno plano-convexo e súber cicatricial. Por hidrodestilação, foi obtido um rendimento de 4% de óleo essencial com folhas secas e 2,5% com folhas frescas. Por CG-EM, foi evidenciado 1,8-cineol (81,17%) no óleo essencial de folhas secas. Do precipitado obtido do óleo essencial, e por cromatografia em coluna, foi isolado um composto, BAD1, que por CG-EM, revelou ser uma mistura de possíveis três sesquiterpenos, com tempos de retenção muito próximos. A análise fitoquímica revelou a presença de flavonoides, leucoantocianidinas, esteroides e/ou triterpenoides, glicosídeos saponínicos, ácidos fixos, taninos e aminogrupos nos extratos hidroalcoólico e aquoso de folhas secas, caules e cascas do tronco. As folhas secas apresentaram o maior teor de fenólicos totais, comparado aos caules e cascas do tronco. Pelo método fosfomolibdênio, o composto BAD1 e a fração hexano de folhas secas foram as que exibiram as melhores atividades antioxidantes. Porém, pelo método DPPH, as frações aquosas de folhas secas e cascas do tronco foram as que alcançaram os melhores resultados. Na avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, frente às cepas de bactérias gram-negativas, gram-positivas e de *Candida albicans*, as frações de folhas secas apresentaram os melhores resultados. O óleo essencial e o composto BAD1 demonstraram atividades entre moderada e fraca/nula. Considerando estes resultados, são recomendados estudos adicionais, visando o potencial farmacêutico e industrial apresentado pela espécie *Eucalyptus badjensis*.

Palavras-chave: óleo essencial, fenóis totais, fosfomolibdênio, DPPH, método de microdiluição.

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* has great pharmacological potential. *Eucalyptus badjensis* is being studied in Santa Catarina and Parana, to its cultivation in the South of the country, because it shows great resistance to frost, high growth and great potential for production of essential oils. Knowing that the species lacks pharmaceutical studies, the aim of this work was to investigate the morpho-anatomy, chemical composition and biological activities of *E. badjensis*. The plant material was collected during the winter at Embrapa Florestas, Colombo city, Paraná. From the usual methods of optical microscopy and scanning electron microscopy, it was demonstrated uniseriate epidermis, anomocytic stomata on both leaf surfaces, symmetric heterogeneous mesophyll, secretory cavities below the epidermis, crystals of calcium oxalate, bicollateral vascular system as an open arc in plano-convex contour, epicuticular wax and lenticel-like. By hydrodistillation, it was reached 4% yield of essential oil with dried leaves and 2.5% with fresh leaves. By GC-MS it was demonstrated 1,8-cineole (81.17%) in the essential oil from dried leaves. The precipitate of the essential oil, and by column chromatography, it was isolated a compound, BAD1, which by GC-MS has shown to be a mixture of three possible sesquiterpenes with retention times very close. Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, leucoanthocyanidins, steroids and/or triterpenoids, saponins, fixed acids, tannins and amino groups in hydro alcoholic and aqueous extracts of dried leaves, stems and stem bark. The dried leaves showed the highest total phenolic content, compared to the stems and stem bark. By the phosphomolybdenum method, the compound BAD1 and the hexane fraction of dried leaves exhibited the best antioxidant activity. However, the DPPH method, the aqueous fractions of dried leaves and stem bark achieved the best results. In the evaluation of antimicrobial activity by broth microdilution, against the strains of gram-negative and gram-positive and *Candida albicans* the fractions of dried leaves have the best results. The essential oil and the compound BAD1 showed activity between moderate and low/nil. Considering these results, further studies are recommended, aimed at pharmaceutical and industrial potential presented by *Eucalyptus badjensis*.

Key words: essential oil, total phenols, DPPH, phosphomolybdenum, microdilution method.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO GÁLICO	71
GRÁFICO 2 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO E À RUTINA PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO	80
GRÁFICO 3 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO AQUOSA DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH.....	83
GRÁFICO 4 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO AQUOSA DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH.....	83
GRÁFICO 5 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ETANOL DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH.....	83
GRÁFICO 6 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ETANOL DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH.....	844
GRÁFICO 7 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH	84
GRÁFICO 8 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH.....	84
GRÁFICO 9 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH	855
GRÁFICO 10 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH.....	85
GRÁFICO 11 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH.....	85
GRÁFICO 12 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH.....	866
GRÁFICO 13 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH.....	86
GRÁFICO 14 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO BAD1, PELO MÉTODO DPPH.....	86
GRÁFICO 15 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DPPH.....	877

GRÁFICO 16 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA RUTINA, PELO MÉTODO DPPH	87
---------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRINCIPAIS COMPOSTOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus.sp</i>	33
FIGURA 2 - NÚCLEO FLAVÔNICO 2-FENIL-BENZOPIRANO	35
FIGURA 3 - FLAVONÓIDES ENCONTRADOS EM <i>Eucalyptus</i>	36
FIGURA 4 - COMPOSTOS BIOATIVOS ENCONTRADOS EM <i>Eucalyptus</i>	41
FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO DA MICROPLACA 01 NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO DA MICROPLACA 02 NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO DA MICROPLACA 03 NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
FIGURA 8 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE <i>E. badjensis</i> , POR CROMATOGRAFIA GASOSA: 1: α -PINENO, 2: LIMONENO, 3: 1,8-CINEOL, 4: α -TERPINEOL, 5: ALO-AROMADENDRENO, 6 – 7: NÃO IDENTIFICADOS	63
FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO BAD1, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA: 1:ALO-AROMADENDRENO, 2-3: COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS	65
FIGURA 10 - ESPETRO DE MASSAS DO ALO-AROMADENDRENO.....	65
FIGURA 11 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO DE ÍNDICE DE KOVAT'S = 1658.....	65
FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO DE ÍNDICE DE KOVAT'S = 1661.....	66
FIGURA 13 - SECÇÕES PARADÉRMICAS DA FOLHA: A - FACE ADAXIAL. B - FACE ABAXIAL. ET: ESTÔMATO (MICROSCOPIA FOTÔNICA = MF)	73
FIGURA 14 - SUPERFÍCIE FOLIAR REVELANDO OS ESTÔMATOS: A - FACE ADAXIAL. B- FACE ABAXIAL (MEV).....	74
FIGURA 15- EPIDERME REVELANDO SÚBER CICATRICIAL: A - FACE ADAXIAL. B - FACE ABAXIAL. SC: SÚBER CICATRICIAL (MEV).	75
FIGURA 16 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA. ET: ESTÔMATO, Ab: FACE ABAXIAL, CT: CUTÍCULA, Epl: EPIDERME INFERIOR, SC: SÚBER	

CICATRICIAL, PP: PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, PL: PARÊNQUIMA LACUNOSO, FV 1º: FEIXE VASCULAR DE MAIOR PORTE, FV 2º: FEIXE VASCULAR DE MÉDIO PORTE, CS: CAVIDADE SECRETORA, EpS: EPIDERME SUPERIOR, Ad: FACE ADAXIAL (MF). 75

FIGURA 17 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA. A- SÚBER CICATRICIAL EM DETALHE. B- IDIOBLASTOS COM CRISTAIS EM DETALHE. CT: CUTÍCULA, EPI: EPIDERME INFERIOR, SC: SÚBER CICATRICIAL, PP: PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, PS: PARÊNQUIMA LACUNOSO, CS: CAVIDADE SECRETORA, EP: EPIDERME, CR: IDIOBLASTO COM CRISTAL DE OXALATO DE CÁLCIO (MF)..... 75

FIGURA 18 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA MOSTRANDO O FEIXE VASCULAR DE GRANDE PORTE EM DETALHE. A- PARTE SUPERIOR DO FEIXE. B- PARTE INFERIOR DO FEIXE. CU: CUTÍCULA, EPs: EPIDERME SUPERIOR, BE: BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, FL: FLOEMA, XL: XILEMA, Epl: EPIDERME INFERIOR, CR: CRISTAIS (MF). 77

FIGURA 19 - SUPERFÍCIE FOLIAR REVELANDO CERA EPICUTICULAR: A- FACE ADAXIAL. B- FACE ABAXIAL. CE: CERA EPICUTICULAR (MEV). 78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>E. badjensis</i> POR HIDRODESTILAÇÃO.....	57
TABELA 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS, E OS VALORES PRECONIZADOS PELO ISO 3095-1974.....	59
TABELA 3 - CRAMOTOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE <i>E. badjensis</i>	61
TABELA 4 - CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA DO COMPOSTO BAD1.....	64
Tabela 5 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE RESÍDUOS SECOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE <i>E. badjensis</i>	66
TABELA 6 - BIOATIVOS NOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E/OU FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, CAULES E CASCAS DO TRONCO DE <i>E. badjensis</i>	67
TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>E. badjensis</i>	69
TABELA 8 - METABÓLITOS DETECTADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS SECAS, CAULES E CASCAS DO TRONCO DE <i>E. badjensis</i>	69
TABELA 9 - FENÓLICOS TOTAIS DE FOLHAS SECAS, CAULES E CASCAS DO TRONCO DE <i>E. badjensis</i>	72
TABELA 10 - RENDIMENTOS APRESENTADOS DAS FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS E CASCAS DO TRONCO DE <i>E. badjensis</i>	79
TABELA 11 - EC ₅₀ DAS AMOSTRAS E SUBSTÂNCIAS REFERÊNCIA NO ENSAIO ANTIOXIDANTE DO DPPH	88
TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE <i>Eucalyptus badjensis</i> FRENTE A <i>Proteus mirabilis</i> , MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO.....	89
TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE	

	<i>Eucalyptus badjensis</i> FRENTE A <i>Escherichia coli</i> , MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO.....	90
TABELA 14 -	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE <i>Eucalyptus badjensis</i> FRENTE A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO	90
TABELA 15 -	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE <i>Eucalyptus badjensis</i> FRENTE A <i>Staphylococcus epidermidis</i> , MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO	91
TABELA 16 -	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE <i>Eucalyptus badjensis</i> FRENTE A <i>Candida albicans</i> , MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO.....	91
TABELA 17 -	CLASSIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS ALCANÇADAS PELAS AMOSTRAS, SEGUNDO MACHADO <i>et al</i> (2005)	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração fungicida mínima
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
°C	Grau Celsius
d_{20}^{20}	Densidade relativa a 20 °C
d	Densidade
dm	Decímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>et al.</i>	Expressão latina abreviada et alli, (=e outros)
EC ₅₀	Concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH
FAA	Fixador de tecidos vegetais constituído de formol, ácido acético e álcool etílico
g	Gramas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	International Standard Organization
kPa	Pascal
m	Massa
m	Metro
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mo	Molibdênio
mm	Milímetro
MV	Material vegetal
m1	Massa do picnômetro com água
m2	Massa do picnômetro com óleo
m3	Massa do picnômetro vazio
m/m	Relação massa/massa
m/v	Relação massa/volume
m/z	Relação massa/carga
NaOH	Hidróxido de sódio

n_D^{20}	Índice de refração a 20 °C
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
S	Sul
SM	Solução mãe
TTC	2,3,5-trifenil-tetrazólio
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultravioleta
v	Volume
VIS	Visível
W	Oeste
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromol
$ \alpha _D^{20}$	Poder rotatório específico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	24
3.2 FAMÍLIA MYRTACEAE	25
3.3 GÊNERO <i>EUCALYPTUS</i>	25
3.3.1 <i>Eucalyptus badjensis</i> Beuzeville & Welch	27
3.4 PRINCIPAIS METABÓLITOS NO GÊNERO <i>EUCALYPTUS</i>	27
3.4.1 Óleos essenciais	27
3.4.1.1 Generalidades.....	27
3.4.1.2 Atividades biológicas	29
3.4.1.3 Óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> sp	31
3.4.1.4 Uso comercial de óleos essenciais de <i>Eucalyptus</i> sp.....	32
3.4.2 Compostos fenólicos	34
3.4.3 Flavonoides	34
3.4.3.1 Taninos	36
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	38
3.5.1 Atividade antioxidante.....	38
3.5.2 Atividade antimicrobiana	39
3.5.3 Atividades biológicas do gênero <i>Eucalyptus</i>	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO	42
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS	42
4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	43
4.3.1 Determinação do rendimento de óleo essencial.....	43
4.4 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS	44
4.4.1 Densidade relativa	44
4.4.2 Índice de refração	44
4.4.3 Poder rotatório específico	44

4.4.4 Solubilidade em etanol	45
4.4.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).....	45
4.5 ANÁLISE QUÍMICA DO COMPOSTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS	46
4.5.1 Isolamento de composto BDA1 do óleo essencial de folhas secas.....	46
4.5.2 Perfil cromatográfico dos compostos isolados.....	47
4.5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	47
4.5.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM)	47
4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	47
4.6.1 Preparo e fracionamento	47
4.6.2 Caracterização dos metabólitos	48
4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO	49
4.7.1 Preparo dos extratos aquosos	49
4.7.2 Caracterização dos metabólitos	49
4.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	49
4.9 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE FOLHAS	50
4.10 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	51
4.10.1 Preparo das frações	51
4.10.2 Atividade antioxidante	52
4.10.2.1 Método do fosfomolibdênio.....	52
4.10.2.2 Método DPPH	53
4.10.3 Atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 TEOR DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DAS FOLHAS SECAS.....	57
5.2 ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS	57
5.2.1 Rendimento de óleo essencial.....	57
5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS	58
5.3.1 Densidade relativa	59
5.4 ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	59
5.4.1 Poder rotatório específico	60
5.4.2 Solubilidade em etanol	60
5.4.3 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa	60
5.5 COMPOSTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS.....	63
5.5.1 Isolamento de compostos	63

5.5.2 Perfil cromatográfico do composto isolado.....	63
5.5.2.1 Cromatografia em camada delgada.....	63
5.5.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa.....	64
5.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS	66
5.6.1 Características Organolépticas.....	66
5.6.2 Compostos bioativos	66
5.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS	68
5.7.1 Características Organolépticas.....	68
5.7.2 Compostos presentes nos extratos aquosos	69
5.8 FENÓLICOS TOTAIS	71
5.9 MORFOANATOMIA DE FOLHAS	73
5.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	78
5.10.1 Rendimentos das frações	78
5.10.2 Atividade antioxidante	79
5.10.2.1 Método do fosfomolibdênio.....	79
5.10.2.2 Método DPPH	82
5.10.3 Atividade antimicrobiana - método da microdiluição	88
6 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Na antiguidade o tratamento das diversas enfermidades era baseado no emprego de plantas preparadas das mais variadas formas. Nessa época, substâncias aromáticas vegetais eram utilizadas como medicamentos, condimentos alimentares e também como perfumes (PROS, 1976).

O cultivo de espécies de *Eucalyptus* no Brasil iniciou em meados do século passado. Em 1994, o Brasil já possuía a maior área de plantação de *Eucalyptus* do mundo, chegando perto dos três milhões de hectares. Naquela época, essas árvores eram, principalmente, destinadas para a obtenção de madeira, celulose, taninos, óleos essenciais e mel (ELDRIGDE, 1994).

Os óleos essenciais são substâncias com inúmeras atividades farmacológicas, e que podem ser aplicados em diversas áreas. Esses fatores fazem com que alguns autores direcionem seus trabalhos ao estudo desses compostos. É evidente a utilização do óleo essencial em indústrias de alimentos, cosméticos, domissanearios ou mesmo em medicamentos farmacêuticos e também, na área ambiental e econômica (ESTANISLAU *et al.*, 2001).

Entre os principais constituintes dos óleos essenciais de eucaliptos está o 1,8-cineol, que é muito utilizado na indústria farmacêutica e de removedores de mancha. O felandreno, também muito encontrado nesses óleos, é empregado na indústria de solvente e flutuação de metais. Também é conhecida a presença do eudesmol, usado como fixador de perfumes; terpineol, com uso no ramo da perfumaria; acetato de eudesmila, empregado como substituto da essência de bergamota; piperitona, matéria-prima para produção de timol e mentol sintéticos (FAO, 1979; SEGREDOS, 1993; LORENZI; MATOS, 2002).

Os polifenóis, principalmente flavonoides e taninos, são um grupo de metabólitos muito encontrado entre as espécies de *Eucalyptus*. Visto que essas substâncias possuem grande potencial terapêutico, é de grande interesse investigá-las.

As plantas destinadas ao uso medicinal devem ter seu uso cientificamente aprovado e comprovado. Para isso, é necessário o desenvolvimento de estudos que explorem a sua composição química, eficiência terapêutica, toxicologia, segurança de uso, entre outros aspectos (ROCHA; SANTOS, 2007).

Aos metabólitos bioativos, presentes no gênero *Eucalyptus*, são atribuídos várias atividades biológicas; foi evidenciado ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, hipoglicemiante, anti-inflamatória, adstringente, cicatrizante. Esse gênero e seus compostos também possuem grande potencial como desinfetantes e inseticidas (ESTANISLAU *et al.*, 2001; GUTIÉRREZ, 2002; LORENZI; MATOS, 2002, MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009; BOSCARDIN *et al.*, 2010).

Nos dias de hoje, instituições governamentais e não governamentais têm explorado e incentivado a busca por conhecimentos farmacológicos, químicos, toxicológicos e clínicos de constituintes ativos de plantas medicinais.

Este estudo teve como propósito a ampliação dos conhecimentos sobre a espécie de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, uma espécie cultivada no sul do país; uma espécie promissora, rica em óleos essenciais e compostos polifenólicos, que devem ser realizados, para que as potencialidades de *E. badjensis* possam ser bem mais exploradas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Efetuar a caracterização fitoquímica, a morfoanatomia e avaliar as atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e preparar o material botânico para análise;
- Determinar o teor de umidade das folhas;
- Extrair e determinar o rendimento do óleo essencial de folhas secas e frescas;
- Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial de folhas secas;
- Identificar e quantificar a composição química do óleo essencial de folhas secas, através de Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa;
- Desenvolver a análise fitoquímica dos metabólitos secundários presentes nas folhas secas, caules e cascas do tronco;
- Obter frações dos extratos de folhas secas e cascas do tronco;
- Realizar o estudo morfoanatômico das folhas;
- Quantificar os fenólicos totais das folhas secas, caules e cascas do tronco;
- Determinar a atividade antioxidante das frações, do óleo essencial de folhas secas e do composto isolado do óleo essencial de folhas secas;
- Determinar a atividade antimicrobiana das frações obtidas de folhas secas, do óleo essencial e do composto isolado do óleo essencial de folhas secas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas como medicamentos é muito antigo e foi passado de gerações a gerações: egípcios, gregos, romanos, período renascentista. Porém, somente a partir do final do século XVIII foi que ocorreu um grande e rápido progresso das ciências modernas, propiciando uma elevada evolução nos conhecimentos sobre tais vegetais. Assim, os estudos do reino vegetal e suas drogas são apoiados em áreas muito variadas, como Bioquímica, Genética, Histologia, Citologia, Paleontologia e Geografia (SEGREDOS, 1993).

Cerca de um quarto de todos os fármacos aplicados na terapêutica atual foi obtido direta ou indiretamente da natureza, principalmente de vegetais superiores (YUNES; CALIXTO, 2001).

A busca por conhecimentos farmacológicos, químicos, toxicológicos e clínicos sobre constituintes ativos de plantas tem sido muito explorada e incentivada por instituições governamentais e não governamentais. Na Alemanha, a Comissão E, do Ministério da Saúde, publicou aproximadamente 300 monografias que se referem à eficácia, efeitos secundários e contra-indicações de drogas vegetais. No mesmo âmbito, a *European Scientific Cooperation on Phytotherapy* (ESCOP) publicou dezenas de monografias sobre fitoterápicos europeus, e também vem realizando reuniões para elevar o conhecimento científico sobre o assunto (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Para que uma planta medicinal tenha seu uso cientificamente aprovado é necessário o desenvolvimento de estudos relacionados à sua eficiência terapêutica, toxicologia, segurança de uso, entre outros aspectos. Quando esses objetivos são alcançados, é possível assegurar o seu uso pelas populações em suas mais básicas necessidades de saúde, devido ao fácil acesso, baixo custo e também devido à compatibilidade cultural com as tradições regionais do uso de plantas no tratamento de enfermidades (ROCHA; SANTOS, 2007).

3.2 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família possui cerca de 100 gêneros, englobando cerca de 3000 espécies. Considerada a maior família da ordem Myrtales, possui dois grandes centros de dispersão; as Américas e a Austrália. Nas Américas são comuns a goiaba, araçá, jabuticaba, pitanga, guabiroba, entre outras. Na região da Austrália destaque para as espécies introduzidas no Brasil, como *Eucalyptus*, *Callistemon* e *Melaleuca* (JOLY, 1985).

Encontradas na forma de árvores e arbustos, os vegetais dessa família possuem principalmente nas partes aéreas da planta, unidades unicelulares ou pluricelulares que abrigam óleos essenciais em abundância. Os maiores gêneros são *Eugenia*, com cerca de 600 representantes, *Eucalyptus* (500), *Myrcia* (300), *Syzygium* (200) e *Melaleuca* (100) (CRONQUIST, 1981).

No Brasil, as Myrtaceae são consideradas uma das mais importantes famílias de Angiospermae, podendo abranger cerca de 1000 espécies. Considerada um dos grupos arbóreos que predominam na Mata Atlântica, essa família, além de seu elevado número de espécies, também exerce um papel importante na fitossociologia de matas do Sul e Sudeste brasileiro (CRUZ; KAPLAN, 2004).

3.3 GÊNERO *EUCALYPTUS*

O gênero *Eucalyptus* é considerado indígena da região da Austrália e Tasmânia, podendo, nessa área, cobrir cerca de três quartos de toda vegetação, abrangendo os mais variados tipos de clima e solo. Algumas espécies do gênero podem alcançar cerca de 100 metros de altura, tornando-se as maiores angiospermas do planeta (MANGIERI; DIMITRI, 1961; ELDRIDGE, 1994).

Possuem variação latitudinal de ocorrência que vai de 7°N até 43°39'S, propondo que as espécies de eucaliptos tenham desenvolvido genótipos que as adaptam aos mais variados tipos de clima e de solo (LIMA, 1996).

O nome *Eucalyptus* foi designado, em 1788, pelo francês Charles Louis L'Heritier de Brutelle, onde o primeiro deriva de duas palavras gregas: *Eu* (bem) e *Kalypto* (cobrir). Esses termos se referem ao formato globular arredondado dos frutos dessas árvores, onde o opérculo cobre as sementes até que as mesmas estejam totalmente desenvolvidas (FABROWSKI, 2002).

A migração mundial das espécies de eucaliptos ocorreu por volta de 1804, quando sementes australianas de *Eucalyptus globulus* Labill. chegaram à França. Posteriormente, o gênero foi sendo instalado em outros países da Europa, África, Ásia, América do Norte e América do Sul, chegando ao Brasil entre os anos de 1855 e 1870. No começo, essas plantas eram cultivadas para oferecer proteção do vento, servir como espécies ornamentais e também pelas suas qualidades medicinais. Foi graças ao eucaliptólogo Edmundo Navarro de Andrade, trabalhador da antiga Companhia Paulista de Estradas de Ferro, que o Brasil pôde ser considerado um país cultivador de eucaliptos (PENFOLD, 1961).

No Brasil as ações de florestamento e reflorestamento utilizando-se espécies do gênero alcançaram escala comercial já nas primeiras décadas do século XX. Primeiramente, como são capazes de gerar grande quantidade de biomassa em curto tempo, essas espécies exóticas foram introduzidas e cultivadas no país para suprir a necessidade de combustível e madeira para dormentes, ambos destinados as locomotivas e trilhos da Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Esse fato levou, entre 1904 a 1966, à concentração de cerca de 80% da área plantada de eucalipto no país, situada no Estado de São Paulo. Mas, foi com a chegada do regime militar – autoritário, em meados dos anos 60, que a eucaliptocultura passou a ter um “status” significativo, devido à expansão das indústrias siderúrgicas e às de papel e celulose (SHIVA; PADHYAY, 1991)

De acordo com Eldrige (1994), o Brasil possuía a maior área de plantação de *Eucalyptus* do mundo, chegando perto dos três milhões de hectares. Os principais produtos obtidos através desses plantios são: madeira (construção e combustível), celulose (fabricação de papel), taninos (curtimento de couros), óleos essenciais (indústria farmacêutica) e mel.

Durante as altas temperaturas de verão frequentemente observa-se a formação de uma névoa azulada ao redor das árvores de eucalipto. Isso se deve à evaporação dos óleos essenciais presentes na planta, principalmente nas folhas, gerando a famosa expressão de “florestas azuis da Austrália”. A evaporação dos óleos libera substâncias antissépticas que podem ajudar a árvore a se proteger do ataque de pestes e pragas (ROCHA; SANTOS, 2007).

3.3.1 *Eucalyptus badjensis* Beuzeville & Welch

Espécie de eucalipto que se caracteriza como árvore de tamanho médio a alto, com imperfeições nas cascas do tronco, sendo estas mais suaves na parte superior do vegetal. Muito utilizada para sombra e abrigo, possui uma madeira de boa qualidade, de cor pálida e moderadamente durável; frutos e flores geralmente de pequeno tamanho com floração entre fevereiro e março. Essa espécie é um híbrido do *Eucalyptus nitens* Maiden com o *Eucalyptus viminalis* Labill, tendo uma distribuição muito restrita, sendo nativa da região leste dos seus países originários (PEN-FOLD, 1961).

Eucalyptus badjensis ocorre principalmente na região sudoeste de Nova Gales do Sul (Austrália), entre 36° e 36°45'S, em altitudes que variam de 800 a 1200 metros. É considerada uma região de clima temperado subúmido que apresenta temperatura média máxima, no mês mais quente, entre 22° e 25°C, e média mínima, na época mais fria, de -4° a 0°C. Nessa região são comuns as geadas, ocorrendo mais de 100 por ano, não excluindo a possibilidade de neve durante o inverno (CARPANEZZI, 1988).

Estudos realizados no Sul do Brasil, mais precisamente em Santa Catarina e Paraná, têm mostrado que *E. badjensis* possui grande resistência a geadas, alta taxa de crescimento e grande potencial para produção de óleos essenciais (HIGA; ALVES, 2002).

Entretanto, a mesma espécie cultivada no Uruguai forneceu um rendimento em óleo essencial de 1,25 %, tendo 85,95% de 1,8-cineol, o principal composto. Relata-se que na Austrália, a mesma planta chega a render 2,8 % de óleo essencial, com 70% de 1,8-cineol em sua composição (MANTERO *et al.*, 2007).

3.4 PRINCIPAIS METABÓLITOS NO GÊNERO *EUCALYPTUS*

3.4.1 Óleos essenciais

3.4.1.1 Generalidades

Os óleos essenciais são substâncias vegetais, obtidas por arraste de vapor d'água ou pela expressão dos pericarpos de frutas cítricas e que possuem um

odor específico, podendo ser encontradas em qualquer parte da planta (BRUNETON, 1991). Estes compostos, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são produzidos em células secretoras especializadas, como células oleíferas, ductos, cavidades ou pelos glandulares, dependendo da família botânica (EVANS, 1996).

O homem domina o conhecimento sobre óleos essenciais vegetais desde alguns séculos antes de Cristo. Os dados históricos que relatam esses acontecimentos, de obtenção e utilização desses óleos, indicam que essa prática teve origem em países orientais, destacando-se Egito, Pérsia, Índia, Japão, China (VITTI; BRITO, 2003).

A localização dessas estruturas secretoras não é fixa para todas as espécies vegetais, sendo possível encontrá-las em determinadas partes ou em toda a planta. Como exemplo dessa distribuição, pode-se citar a presença de óleos essenciais em sementes da noz-moscada, no rizoma do gengibre, nas raízes do vetiver, nas cascas do caule da canela, na madeira do sândalo ou do pau-rosa, nos frutos da laranja e do limão, nas folhas do capim-limão e do eucalipto e nas flores do jasmim e da rosa (VITTI; BRITO, 2003).

Derivados do metabolismo secundário vegetal, os óleos essenciais são formados através de uma complexa mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas e odoríferas, o que lhes conferem os seus intensos e específicos odores. A sua aparência à temperatura ambiente é de um líquido oleoso, porém a característica mais forte dessas substâncias é a volatilidade que apresentam. É esta a principal propriedade que diferencia os óleos essenciais dos óleos fixos (EVANS, 1996; SIMÕES *et al.*, 2007).

O órgão ou a estrutura onde são formados e estocados os óleos etéreos, em cada planta, influencia muito na sua composição final, sendo relatadas variações químicas e físico-químicas, até mesmo, entre óleos extraídos de diferentes partes de uma mesma planta. Outros fatores que podem variar a composição desses óleos etéreos, mesmo entre espécies vegetais iguais, são a época de coleta, processo de obtenção e de secagem do material, condição climática e de solo da região, localização geográfica e ciclo vegetativo da espécie (VITTI; BRITO, 2003; FRANCO, 2005).

Dentre as propriedades dessas substâncias relata-se a alta solubilidade em solventes orgânicos, porém praticamente insolúveis na água, mas o bastante para impregnar a água com o seu odor quando são misturados. Também, exibem alto índice de refração e a maioria é opticamente ativo, onde geralmente pode-se

usar as rotações específicas como método de caracterização. Como não são formados por ésteres glicéricos dos ácidos graxos, os óleos essenciais não deixam mancha gordurosa permanente quando em contato com papel e também não se pode saponificá-los com bases (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Em geral, pode-se dizer que, grande parte dos óleos voláteis consiste em uma mistura de hidrocarbonetos, como os terpenos, e de compostos oxigenados, como alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, lactonas, cumarinas, óxidos, peróxidos, furanos, ésteres, éteres, fenóis, ácidos orgânicos, entre outros. Dentre os seus constituintes, aqueles que aparecem em maiores concentrações são chamados de componentes principais; os que possuem baixíssimas concentrações são designados como componentes traços. Essa situação ocorre com o 1,8-cineol, que está presente em concentrações perto de 80%, nos óleos de espécies de eucalipto. Enquanto que no óleo de bergamota está em torno de 0,002% (FABROWSKI, 2002; VITTI; BRITO, 2003; FRANCO, 2005).

Baseado na biossíntese dos óleos voláteis, os seus componentes podem ser agrupados em duas categorias; os derivados de terpenoides, que são formados através da via do ácido mevalônico-acetato, e os compostos aromáticos advindos da via do ácido chiquímico-fenilpropanoides. Sabe-se que, são descritos mais de 8.000 compostos terpênicos na literatura, onde os de maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos, de 10 carbonos, e os sesquiterpenos, com 15 carbonos. Os compostos derivados do ácido chiquímico-fenilpropanoides são os com menor frequência, podendo-se citar os alilfenóis, propenilfenóis e os aldeídos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007).

Para o vegetal, esses compostos são importantes, pois desempenham funções como a de atrair polinizadores, proteger contra predadores, inibir a germinação de outras plantas vizinhas (alelopático), evitar a perda excessiva de água e a elevação da temperatura (BRUNETON, 1991; SIMÕES *et al.*, 2007).

3.4.1.2 Atividades biológicas

Muitas plantas utilizadas na medicina tradicional têm seus efeitos farmacológicos oriundos da presença de óleos essenciais, em outros casos, o medicamento usado é o próprio óleo isolado de tal planta. Como exemplo, cita-se o uso do alecrim (*Rosmarinum officinalis*) e de seu óleo volátil, onde o óleo puro possui ação

antibacteriana, enquanto que a infusão da planta é designada para o tratamento dos sintomas de problemas digestivos variados, devido às propriedades antiespasmódica e colerética causadas por ácidos fenólicos presentes no vegetal (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007).

A garantia e a determinação da ação biológica de um óleo essencial são de grande dificuldade, isso porque a sua composição é muito complexa e pode ser alterada por vários fatores. Assim, com dificuldade, conseguem-se atribuir alguns efeitos biológicos a certos constituintes presentes em uma espécie de óleo volátil, porém não é possível garantir que a mesma ação estará presente ou se terá o mesmo grau de intensidade em outras amostras da mesma espécie de óleo (BRUNETON, 1991; COSTA, 2002).

Alguns efeitos farmacológicos dos óleos etéreos e de seus constituintes são bem destacados e estabelecidos. Nesse contexto, como exemplo, pode-se citar a ação antisséptica, não somente sobre bactérias, mas também contra fungos e leveduras; ação carminativa dos óleos de menta (*Mentha* sp) e funcho (*Foeniculum* sp), facilitando a expulsão do ar do trato gastrointestinal; ação digestiva do óleo de gengibre (*Zingiber* sp), pois estimula as secreções do aparelho digestivo; ação cardiovascular de óleos contendo cânfora (*Cinnamomun* sp), levando ao aumento do ritmo cardíaco e da pressão arterial e, a ação anti-inflamatória, atribuída principalmente aos óleos que possuem azuleno. A ação expectorante do eucalipto, devida ao efeito irritante sobre as mucosas; efeitos sobre o músculo liso, utilizado na dismenorrea ou como abortivo, quando em doses elevadas; ação sobre o sistema nervoso central podendo estimular ou deprimir esse sistema (BRUNETON, 1991; COSTA, 2002; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007).

Outra atividade dos óleos voláteis que se deve relevar é a toxicidade que eles podem causar em certos casos. Isso porque, a denotação de ser um produto natural acaba levando a um uso indiscriminado dessas substâncias pelas pessoas. Também, é importante salientar a diferença que há entre a toxicidade causada por plantas ricas nesses óleos e os óleos essenciais puros, isolados dessas plantas (BRUNETON, 1991; SIMÕES *et al.*, 2007).

Em geral, os óleos etéreos apresentam toxicidade elevada, podendo causar de irritações cutâneas até reações no sistema nervoso central, onde o que determina a intensidade dos efeitos é principalmente a via de administração. A via oral, quando comparada a via tópica, é a que oferece maior risco, sendo, nesse caso, os

óleos voláteis mais tóxicos aqueles que apresentam elevado número de insaturações. Como exemplo de toxicidade dos óleos, refere-se a hepatotoxicidade que pode ser desencadeada pelo safrol, uma substância encontrada nos óleos essenciais de noz-moscada (*Nux sp*) e sassafrás (*Ocotea sp*) (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; OGA, 2003).

3.4.1.3 Óleos essenciais de *Eucalyptus sp*

Praticamente todas as espécies de *Eucalyptus* possuem em suas folhas, mais especificadamente no mesófilo, glândulas especializadas na produção de óleos, as quais conferem às folhas seus odores característicos. Esses óleos produzidos, chamados de óleos essenciais, compreendem um conjunto de substâncias oleíferas, onde cada espécie de *Eucalyptus* possui uma gama de óleos característicos, que lhe confere seu aroma único e também o seu destino no meio industrial (FAO, 1979; EVANS, 1996). São as folhas adultas do eucalipto que possuem a maior quantidade de óleos etéreos. Tais óleos têm a aparência de um líquido fluido, incolor ou levemente amarelado, podendo ter algumas vezes tons acastanhados ou esverdeados, possuem um aroma forte característico, que lembra a cânfora, e sabor picante, de início ácido e final refrescante (COSTA, 2002; SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

Representados como uma grande mistura de compostos orgânicos voláteis, esses óleos etéreos chegam a ser formados por até mais de 100 componentes. Dentre os seus compostos (Figura 1), os mais encontrados são os monoterpenos (1,8-cineol ou eucaliptol, citronelal e pinenos) e os sesquiterpenos (β -eudesmol, globulol); outros constituintes da essência incluídos na porcentagem de 20 a 30 % são a piperitona, felandreno, butiraldeído e hexanal. Em menor número ocorre a presença de outros terpenoides (limoneno, mirceno, terpineno e terpinoleno), compostos orgânicos, hidrocarbonetos, alcoóis (isoamílico, borneol e α -terpineol), aldeídos gordos (butírico, isovalérico, caproico), cetonas, e outras substâncias (CHAGAS *et al.*, 2002; COSTA, 2002; FABROWSKI, 2002; SALGADO *et al.*, 2003; BOSCARDIN *et al.*, 2010).

Das mais de 600 espécies de eucaliptos que são conhecidas, aproximadamente 200 desfrutam de estudos sobre a produção e teor de óleos voláteis, onde

por volta de 20 foram mencionadas como fontes de exploração mercantil (VITTI; BRITO, 2003).

Os principais destinos de alguns constituintes encontrados com frequência nos óleos voláteis de *Eucalyptus* são: 1,8-cineol, designados à indústria farmacêutica e de removedores de mancha; felandreno para a indústria de solvente e flutuação de metais; eudesmol usado como fixador de perfumes; terpineol com uso no ramo da perfumaria; acetato de eudesmila como substituto da essência de bergamota; piperitona matéria-prima para produção de timol e mentol sintéticos (FAO, 1979; SEGREDOS, 1993; LORENZI; MATOS, 2002).

3.4.1.4 Uso comercial de óleos essenciais de *Eucalyptus* sp

Para a comercialização, os óleos derivados de espécies de *Eucalyptus* são classificados de acordo com o seu destino final, como óleos medicinais, óleos para setor de perfumaria e óleos para o campo industrial. O rendimento de óleos etéreos nesse gênero fica entre 0,8% e 3%, onde espécies que apresentarem rendimento de cerca de 1% de cineol e eudesmol já são consideradas de bom retorno financeiro (FAO, 1979; TYLER; BRADY; ROBBERS, 1988; VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos voláteis que exibem o 1,8-cineol como seu componente majoritário, com concentração acima de 70% é chamado de óleos medicinais. Para esse uso, os mesmos não podem demonstrar grandes quantidades de felandreno e aldeídos, máximo de 5%, devido aos seus efeitos tóxicos sobre o organismo. Os óleos classificados como medicinais são destinados à produção de expectorantes, inalantes, estimulantes da secreção do sistema respiratório, antissépticos, produtos de higiene bucal e como flavorizantes de medicamentos em geral, principalmente associados ao mentol (EVANS, 1996; SIMÕES *et al.*, 2007; ROCHA; SANTOS, 2007, MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009).

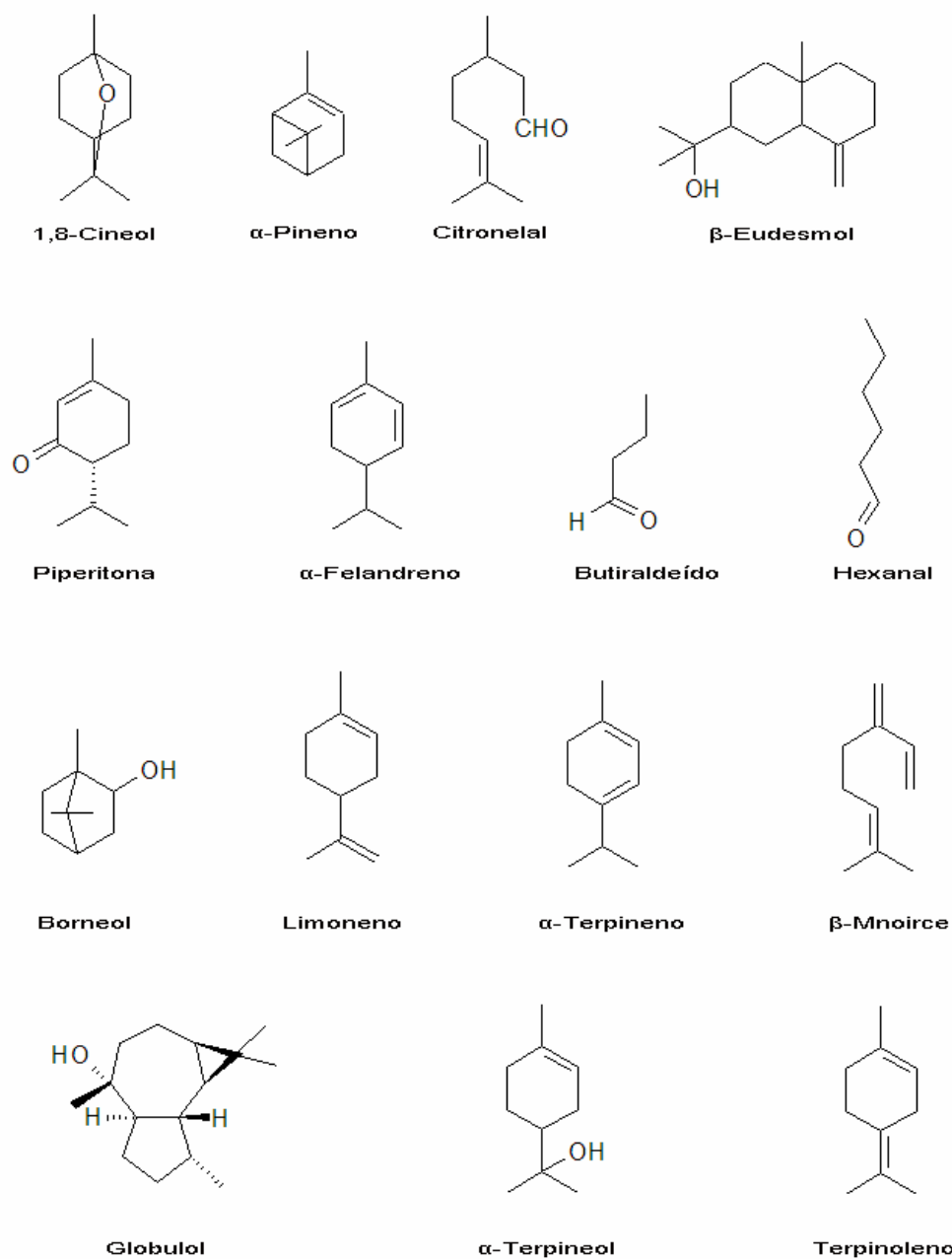


FIGURA 1 – PRINCIPAIS COMPOSTOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus.sp*
 Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

Óleos industriais são aqueles onde ocorre a presença de felandreno e piperitona como compostos de majoritária concentração. O felandreno é usado como solvente de tintas e como matéria-prima na fabricação de desodorizantes e desinfetantes. A piperitona serve de precursor na produção do timol, substância utilizada

como preservativo de gomas, pastas e colas, e do mentol, que é um flavorizante de produtos medicinais e alimentícios (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos designados à produção de perfumes são aqueles que demonstram como principais compostos, principalmente, o citronelal, citral, geraniol, eudesmol e o acetato de geraniol. Essas substâncias são destinadas à composição de perfumes e de produtos, como sabonetes, cosméticos, perfumes, desinfetantes, entre outros (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; VITTI; BRITO, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007; VITTI; ROCHA; SANTOS, 2007).

No Brasil, as espécies de *Eucalyptus* mais exploradas para extração de óleos essenciais são *E. globulus* Labill., *E. citriodora* Hook, *E. benthamii* Maiden & Cambage, *E. staigeriana* F.v.M., *E. smithii* Baker, *E. polybractea* Baker, *E. dives* Schau., *E. macarthuri* Deane & Maiden e *E. maideni* F.v.M. (FABROWSKI, 2002; COSTA, 2002; VITTI; BRITO, 2007; BOSCARDIN *et al.*, 2010).

3.4.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos compreendem o maior grupo de metabólitos bioativos no reino vegetal. São constituintes muito importantes em diversas plantas medicinais e na indústria alimentícia, onde agem como flavorizantes, aromatizantes e antioxidantes. A classe é representada pelos compostos fenólicos simples, taninos, cumarinas, antraquinonas, naftoquinonas, flavonoides, antocianidinas e antocianinas, ligninas e lignanas (EVANS, 1996).

3.4.3 Flavonoides

Com cerca de 13 classes, o grupo flavonoide pode ser descrito como de compostos fenólicos, que são incluídos no grupo de substâncias que apresentam o núcleo $C_6 - C_3 - C_6$, derivado do ácido chiquímico, em suas estruturas químicas. Nesse núcleo, dois anéis de 6 carbonos são conectados por uma cadeia alifática de 3 carbonos (ROBINSON, 1991; TRUEBA, 2003).

Esses metabólitos vegetais formam um grupo muito extenso e estão entre os mais distribuídos no reino vegetal, tendo mais de 8.000 compostos relatados, seja na forma livre ou na de heterosídeos (TYLER; BRADY; ROBBERS, 1988; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; ARAUJO *et al.*, 2005).

A esse núcleo é adicionado um átomo de oxigênio para constituir o anel heterocíclico oxigenado central, formando assim, o 2-fenil-benzopirano, núcleo fundamental dos flavonoides (Figura 2). Cada anel da estrutura tricíclica recebe uma letra para sua designação, sendo o anel central C, o da direita B e o da esquerda A, onde o número e posição de radicais oxigenados ligados a eles irão definir a qual grupo pertence (ROBINSON, 1991; COSTA, 2002).

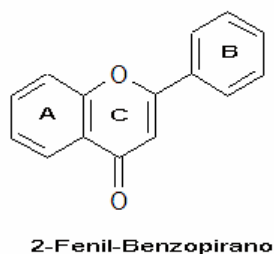


FIGURA 2 - NÚCLEO FLAVÔNICO 2-FENIL-BENZOPIRANO
Fonte: EVANS, 1996.

As principais classes do grupo dos flavonoides são representadas pelos flavonóis, flavonas, chalconas, di-hidrochalconas, auronas, flavanonas, flavanas, catequinas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas, biflavonoides e neoflavonoides (SIMÕES *et al.*, 2007; DORNAS *et al.*, 2007).

Sob o ponto de vista de função vegetal, os flavonoides são, em geral, pigmentos vegetais, destinados, principalmente, ao processo de atração ou repulsão de insetos, reguladores de crescimento e de fotossíntese e ação antimicrobiana. Alguns apresentam a zona de absorção próxima do ultravioleta, orientando os insetos polinizadores até o néctar das flores (ROBINSON; 1991; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Os flavonoides apresentam variadas ações farmacológicas, anti-inflamatórias, antialérgicas, hepatoprotetoras, antiespasmódicas, tratamento de arteriopatas, sedativas, ansiolíticas, porém, a mais conhecida é a antioxidante. Com a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes, os flavonoides mostram habilidade em ativar sistemas de enzimas, incluindo ciclooxigenases e hipoxigenases e de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas (SILVA *et al.*, 2002).

Esses compostos desenvolvem o efeito antioxidante graças as suas características estruturais, que é a presença de uma estrutura de três anéis com radicais oxigenados ligados a ele. No anel C, grupos hidroxil ligados na posição carbônica 3 e as duplas ligações entre os carbonos 2 e 3, unidos ao número de radicais hidroxil ligados aos anéis A e B, são as modificações que aumentam esta propriedade farmacológica (SIMÕES *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2008).

O potencial antioxidante de compostos presentes em vegetais é uma área de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos (ABE *et al.*, 2009).

Presentes na maioria das plantas, os flavonoides também foram detectados em espécies de *Eucalyptus*, relatando a presença destes metabólitos, principalmente nas folhas, cascas e na madeira (Figura 3). Dentre os isolados tem-se a rutina, com presença restrita a pouquíssimas espécies, um fármaco utilizado para aumentar a permeabilidade de capilares sanguíneos. A quercetina, um potente anti-inflamatório, o canferol e outros glicosídeos flavônicos também descritos nesse gênero (FAO, 1979; LORENZI; MATOS, 2002).

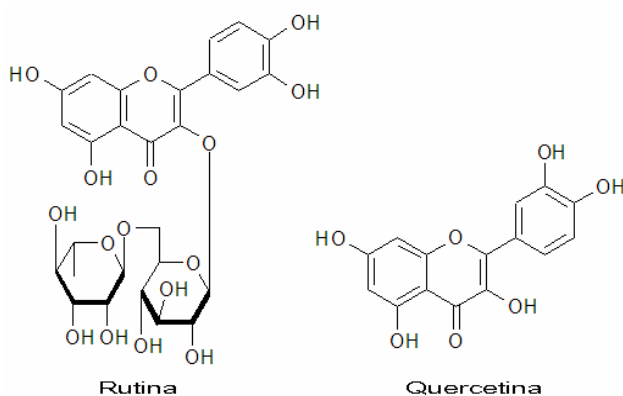


FIGURA 3 - FLAVONÓIDES ENCONTRADOS EM *Eucalyptus*
Fonte: SIMÕES *et al.*, 2007

3.4.3.1 Taninos

Os taninos são um grupo de substâncias complexas que estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo que a maioria das famílias de plantas possui esses metabólitos. Quando o vegetal demonstra grande quantidade de taninos, estes, geralmente, localizam-se em partes específicas da planta, como folhas, frutos, cascas e madeira (TYLER; BRADY; ROBBERS, 1988).

De início, os taninos eram denominados como compostos capazes de se combinar com proteína de pele animal, evitando a decomposição desta e consequente formação do couro. Atualmente, sabe-se que esses metabólitos são compostos polifenólicos hidrossolúveis, com peso molecular entre 500 e 3.000, capazes de precipitar proteínas em geral e também alcaloides (BRUNETON, 1991; EVANS, 1996).

São classificados em dois grupos; o primeiro chamado de taninos hidrolisáveis, que compreende o ácido gálico e o ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com a glicose, onde a presença de ésteres é que caracteriza a facilidade de hidrólise do grupo. O segundo refere-se aos taninos não hidrolisáveis, ou condensados, que são formados basicamente por núcleos fenólicos, sendo resultantes da condensação de duas ou mais moléculas de flavan-3-óis, como a catequina, ou de flavan-3-4-dióis, como a leucocianidina. O termo não hidrolisáveis refere-se à propriedade de que esses compostos têm de se polimerizar e formar compostos insolúveis, quando tratados com substâncias hidrolíticas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os taninos também apresentam atividades biológicas, que estão principalmente ligadas a sua capacidade de complexação com íons metálicos, macromoléculas e polissacarídeos, e a sua atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Assim, já foram relatadas várias atividades desses compostos, como antidiarreica, protetor de feridas externas, antídotos nos envenenamentos, propriedades hemostática nas hemorragias, antibacteriana, antifúngica, tratamento de doenças degenerativas causadas pela peroxidação lipídica, entre outras (COSTA, 2002; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; SIMÕES *et al.*, 2007).

No meio industrial, além do conhecido curtimento de couro, essas substâncias possuem uma variada utilização. Os taninos condensados são capazes de reagir com o formaldeído produzindo polímeros com poder aglutinante, que estão sendo utilizados para reduzir o fluxo de água em barragens, produção de borrachas e fabricação de resinas de troca iônica. Esses metabólitos vegetais também contribuem na fabricação de vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas, sendo cruciais no desenvolvimento do sabor adstringente e aparência desses produtos (SIMÕES *et al.*, 2007).

É conhecida a presença de taninos no gênero *Eucalyptus*, onde as espécies relatadas com maior concentração e uso são as espécies *Eucalyptus astringens*, *Eucalyptus wandoo*, *Eucalyptus grandis*, entre outras (VITAL, 2004).

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.5.1 Atividade antioxidante

Radicais livres são moléculas que apresentam a deficiência de um elétron em sua camada mais externa, permanecendo com outro elétron desemparelhado, o que os tornam espécies altamente reativas. Cerca de 2 a 3% do oxigênio consumido pela célula, durante o processo aeróbico, são convertidos em radicais livres contendo um ou mais elétrons livres em sua órbita. A maior parte desses radicais é produzida nas mitocôndrias, onde a redução do oxigênio leva a formação das três principais espécies reativas do oxigênio; ânion superóxido ($^{\bullet}\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}) (WICKENS, 2001).

Nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano, os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido desenvolvem importantes funções. Porém, quando esses radicais se acumulam no corpo humano, devido a processos fisiopatológicos, fatores ambientais ou escassez de antioxidantes, podem levar ao desenvolvimento de doenças e danos profundos em tecidos. Esses danos ocorrem consequentes ao ataque, às cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e do colesterol, formando os peróxidos lipídicos. Esses peróxidos alteram a fluidez e elasticidade da membrana, e podem levar ao rompimento da célula (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; VASQUÉZ *et al.*, 2008).

Os antioxidantes são compostos que diminuem a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais, podendo ser sintéticos ou naturais. Fisiologicamente as células são protegidas por antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina C, vitamina E, cisteína, ácido úrico, β -caroteno e α -tocoferol, e por fatores enzimáticos, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase/reductase. Porém, a disponibilidade desses antioxidantes diminui com o avanço da idade (MALINOWSKI, 2010)

Entre os antioxidantes de origem natural, é amplamente conhecida a ação dos compostos fenólicos, como os flavonoides e taninos. Esse grupo de metabólitos

pode agir como redutores de oxigênio singleto, atuando nas reações de oxidação lipídica, ou mesmo na quelação de metais. Igualmente, os óleos essenciais conseguem neutralizar radicais livres, e essa ação é muito ligada a sua composição química. As melhores atividades antioxidantes são reveladas pelos óleos essenciais ricos em compostos fenólicos, como o carvacrol, eugenol e timol, devido à presença de um grupamento doador de elétrons na posição *orto* em relação à hidroxila fenólica (BOSCARDIN, 2009; GUIMARÃES; SOUZA, FERREIRA, 2010).

3.5.2 Atividade antimicrobiana

O uso indiscriminado de antibióticos e o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos fazem com que a resistência a medicamentos e disseminação de microrganismos oportunistas cresça de forma descontrolada (MAERTENS; BOOGAERTS, 2000; JOHANN *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais e os compostos fenólicos apresentam grande potencial antimicrobiano. A mistura de terpenoides, encontrada nos óleos essenciais, unida ao seu caráter lipofílico, leva ao acúmulo desses metabólitos na membrana celular microbiana, afetando o seu funcionamento. Os compostos fenólicos também são capazes de sensibilizar os fosfolipídios presentes na bi-camada da membrana celular, causando um aumento da permeabilidade e extravasamento dos componentes intracelulares vitais ou insuficiência dos sistemas de enzimas microbianas (GILLES *et al.*, 2010).

Dentre algumas espécies de microrganismos comumente encontradas pode-se discriminar:

- *Proteus mirabilis*: pertence ao grupo dos bastonetes gram-negativos anaeróbicos facultativos, que do ponto de vista médico, são de grande importância, pois são causadores de doenças no trato gastrointestinal e de outros órgãos. Incluído na família das Enterobacteriaceae, esse flagelado ativamente móvel está relacionado às infecções do trato urinário, feridas e diarreias infantis (BROCK *et al.*, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Escherichia coli*: outro bastonete gram-negativo anaeróbico facultativo da família Enterobacteriaceae, é um dos habitantes mais comuns do trato intestinal. Não é normalmente considerada patogênica, mas em certos casos, como tipo de cepa presente, pode causar infecções no trato urinário, diarreias (diarreia do viajante).

te), e produzir toxinas que causam a gastroenterite por *E. coli* (BROCK *et al.*, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Pseudomonas aeruginosa*: bacilo gram-negativo aeróbico disseminado no solo e na água; é considerado um modelo de microrganismo oportunista. É capaz de sobreviver em situações muito adversas, como em qualquer ambiente úmido, ou crescer em quantidades mínimas mesmo em matérias orgânicas incomuns, como filmes de sabão e adesivos de tampa de catéteres. Também, é resistente a muitos antibióticos e desinfetantes. Frequentemente, causa dermatite, otite externa (ouvido do nadador) e infecções respiratórias (imunodeficientes). Em pacientes queimados, principalmente com queimaduras de segundo e terceiro grau, pode levar a uma infecção muito característica, com pus azul-esverdeado, devido ao pigmento bacteriano piocianina (BROCK *et al.*, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Staphylococcus epidermidis*: classificado como uma bactéria esférica gram-positiva que tende a formar cachos irregulares, que lembra a uva. Coloniza a pele humana, podendo alcançar 90% da flora normal, e apresentam risco de infecções somente quando a barreira cutânea é rompida, como em procedimentos médicos (inserção e remoção de catéteres). Atualmente, é considerado coagulase-negativa, enzima que coagula a fibrina no sangue, e protege os microrganismos contra a fagocitose. Os estafilococos são a causa primária do impetigo do recém-nascido, problema sério em enfermarias hospitalares, caracterizada por vesículas de parede delgada na pele, que se rompem e formam crostas. O maior risco apresentado pelas infecções por estafilococos está relacionado à penetração dos microrganismos na corrente sanguínea, que pode gerar a denominada toxemia (síndrome da pele escaldada) (BROCK *et al.*, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

- *Candida albicans* é uma levedura que, geralmente, tem o seu crescimento suprimido pela flora bacteriana presente no trato geniturinário, intestinal e boca. Os casos de infecções, na maioria das vezes, ocorrem devido ao supercrescimento oportunista, quando a flora local é devastada pelo uso de antibióticos, diminuição do pH da mucosa (vaginite) ou em imunodeprimidos (recém-nascidos, os **portadores de diabetes** e pacientes com AIDS). Dependendo do caso, as infecções podem aparecer como manchas vermelhas, sapinho ou prurido, e em casos extremos pode le-

var à morte (BROCK *et al.*, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; TRABULSI; AL-TERTHUM, 2008).

3.5.3 Atividades biológicas do gênero *Eucalyptus*

Quanto a sua aplicabilidade na terapêutica, esse gênero tem mostrado um espectro de ação muito amplo. Dentre elas, podem-se citar a ação antifúngica; ação antiviral, promovida pelos compostos euglobal 1, euglobal 2 e euglobal 3 (Figura 4), isolados de *E. grandis*; a inibição da ativação do vírus Epstein-Barr desenvolvida pelo euglobal T1, de *E. tereticornis*; atividade anti HIV-Rtase, apresentada pelos macrocarpais A e E, de *E. globulus*; e a ação antibacteriana, relacionada aos macrocarpais A e D, igualmente identificados em *E. globulus*. Também, foi atribuída ação hipoglicemiante, causada pela mirillina, ativo encontrado em *E. citriodora*; adstringente; anti-inflamatória, como a promovida pelo euglobal-1a e a eucaliptona, ativos encontrados em *E. globulus*; cicatrizante e grande potencial como desinfetantes e inseticidas (ESTANISLAU *et al.*, 2001; GUTIÉRREZ, 2002; LORENZI; MATOS, 2002, MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009; BOSCARDIN *et al.*, 2010). Estudos recentes demonstraram o potencial do óleo essencial extraído da espécie *Eucalyptus benthamii* no combate contra o inseto *Pediculus humanus capitis* (piolho do couro cabeludo) (BOSCARDIN, 2009).

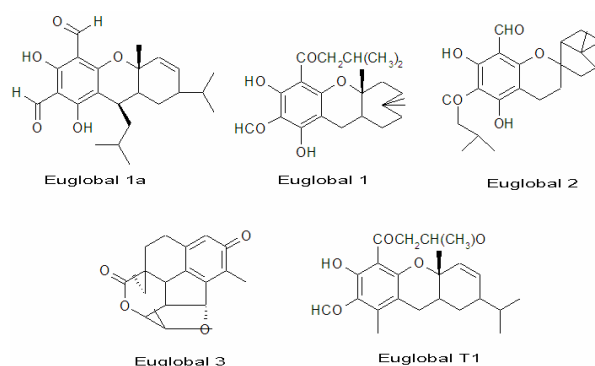


FIGURA 4 - COMPOSTOS BIOATIVOS ENCONTRADOS EM *Eucalyptus*
Fonte: GUTIÉRREZ, 2002.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal para a realização deste trabalho foi coletado de um exemplar de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch cultivado e localizado no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas), situada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as coordenadas geográficas da cidade de Colombo são entorno de 25°17'S de latitude e 49°13'W de longitude, e está a cerca de 920 metros acima do nível do mar.

Foram coletadas folhas adultas, caules e cascas do tronco no período de junho e julho de 2009. Todo o material foi mantido à temperatura ambiente e em local seco por cerca de quinze dias para secagem, até que obtivesse as características desejadas, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988-2005).

As folhas destinadas à extração de óleo essencial de folhas frescas foram imediatamente utilizadas após a coleta ou mantidas a temperatura abaixo de 0°C para posterior análise.

A exsicata está depositada no Herbário da Embrapa Florestas. No momento, é aguardada a confirmação do número de registro.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS

O teor de substâncias voláteis presente nas folhas secas foi determinado pelo método gravimétrico de perda por dessecação, seguindo o proposto por WHO (1998).

Para isso, uma alíquota do material (5 g) foi colocada em uma placa de petri previamente dessecada e pesada. Em seguida, a amostra foi encaminhada a estufa por 6 horas a 105°C, levada ao dessecador até o completo resfriamento e efetuada a pesagem. O mesmo procedimento foi executado até que se obtivesse um peso constante.

Posteriormente foi calculada a porcentagem de substâncias voláteis totais presentes no material vegetal, considerando-se as 5 g como 100% e subtraindo o valor de massa restante após o experimento.

Para avaliar a quantidade real de água presente na amostra foi calculada a massa de óleo também evaporado no ensaio, através da fórmula:

$$d=m/v$$

sendo que v= volume de óleo presente, de acordo com o rendimento obtido na extração do óleo essencial,

e d= a densidade do óleo obtida no ensaio por picnometria.

Assim, subtraindo a massa de óleo da amostra do valor de substâncias voláteis totais, pode-se estimar o valor real de água encontrado no material vegetal.

4.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

A extração do óleo essencial de folhas foi realizada com material fresco e com o material seco. Seguindo a Farmacopeia Brasileira (1988-2005), a extração foi efetuada através da destilação por arraste de vapor d'água com o aparelho de Clevenger, modificado por Wasicky (1963).

Para isso, foi colocado em um balão de 3 litros 100 g de folhas fragmentadas e água destilada suficiente para cobrir o material vegetal. Em seguida o balão foi acoplado ao Clevenger. O tempo de extração foi de 6 horas. Decorrido o tempo necessário para a extração, foi efetuada a leitura final do volume de óleo em mL%.

O mesmo procedimento foi executado tanto para folhas frescas quanto para as secas.

4.3.1 Determinação do rendimento de óleo essencial

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988-2005), o rendimento de óleo essencial foi calculado em % volume/massa, sendo assim, volume de óleo essencial (mL) por massa de material vegetal (g). A análise foi realizada em triplicata.

4.4 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS

4.4.1 Densidade relativa

A densidade relativa (d_{20}^{20}) foi determinada em triplicata conforme a Farmacopeia Brasileira (1988-2005) e a norma NBR 5784: óleos essenciais – determinação da massa específica densidade relativa (ABNT, 1985a), por picnometria.

A calibração do picnômetro compreende a determinação da massa do frasco vazio (m_3) e da massa deste com água destilada (m_1). Colocou-se a amostra de óleo essencial no picnômetro (m_2) à temperatura de 20°C e pesou-se, obtendo-se o peso da amostra pela diferença de massa do frasco cheio e vazio. O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20°C, é a densidade relativa, em que:

$$d_{20}^{20} = (m_2 - m_3)/(m_1 - m_3).$$

4.4.2 Índice de refração

O índice de refração (n_D^{20}) foi determinado em triplicata de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988-2005) e a norma NBR 5785: óleos essenciais – determinação do índice de refração (ABNT, 1985b), empregando o refratômetro ABBE da marca Aus-Jena. Para a análise, ajustou-se o refratômetro de tal modo que, a 20°C, os seguintes índices de refração fossem obtidos: 1,3330 (água destilada) e 1,3651 (etanol 85%) (ABNT, 1985b).

4.4.3 Poder rotatório específico

O poder rotatório específico ($[\alpha]_D^{20}$) do óleo essencial extraído de folhas secas de *E. badjensis* foi estabelecido de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988-2005).

Compostos químicos que desviam o plano da luz polarizada são chamados de opticamente ativos, podendo ser dextrogiros (+) ou levogiros (-). A atividade óptica de uma substância se deve a sua estrutura química e sua concentração. A determinação do poder rotatório auxilia no sentido de estabelecer a identidade e pu-

reza de um composto. O poder rotatório específico de uma substância líquida se refere ao ângulo de rotação, medido no comprimento de onda da raia D de sódio ($\lambda = 589,3$ nm), sob a temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, calculado em função de uma camada de 1 dm de espessura e dividido pela densidade relativa a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para isso, foi utilizado o polarímetro digital Bellingham + Stanley ADP440, com tubo de 1 dm, sob temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O resultado foi dado pela fórmula:

$$|\alpha|_D^{20} = \alpha/d$$

onde α = ângulo de rotação do composto, l = comprimento, em dm, do tubo do polarímetro e d = densidade relativa da substância.

4.4.4 Solubilidade em etanol

A solubilidade em etanol foi determinada de acordo com o prescrito na PHARMACOPEA Helvetica (1993), em etanol 70, 80, 90% e etanol absoluto. Foi colocado o etanol em uma bureta de 25 mL e este foi gotejado sobre a amostra de 0,1 mL de óleo essencial. Após a solubilização total da amostra foi procedida à leitura do volume gasto de etanol na bureta e estabelecida a relação de solubilidade solvente/amostra. A análise foi executada em triplicata.

4.4.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

A identificação e análise quantitativa dos constituintes do óleo essencial de folhas secas foram realizadas em espectrômetro Shimadzu GCMS-QP2010Plus, acoplado a um cromatógrafo gasoso GC-2010 equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). Pressão da coluna de 59 kPa; velocidade linear de 36,8 cm/s e fluxo total de 24,4 mL/min. A rampa cromatográfica foi de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Injetor em modo splitless a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, interface e fonte de ions a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analisando massas entre 40 e 350m/z. Como gás de arraste foi empregado o hélio, a 1mL/min. As amostras foram diluídas em hexano, 1mg/mL, e injetado 1,0 μ L. Os componentes do óleo essencial foram identificados através da biblioteca NIST e das indicações de Adams (2007).

4.5 ANÁLISE QUÍMICA DO COMPOSTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS

Devido à cristalização de um composto, durante a extração do óleo essencial de folhas secas, este material foi denominado de BAD1 e foi analisado mais detalhadamente, a fim de identificá-lo através da espectrometria.

4.5.1 Isolamento de composto BDA1 do óleo essencial de folhas secas

Após a extração do óleo essencial de folhas secas, a substância cristalizada e aderida às paredes do aparelho de Clevenger foi coletado, solubilizado com etanol. Em seguida o solvente foi evaporado ao ar livre, e o resíduo levado ao dessecador por 7 dias. O resíduo foi purificado por cromatografia flash, utilizando filtro de vidro sinterizado, nº 2, 50 mm de altura e 45 mm de diâmetro. A coluna foi preparada com 16,8 g de sílica gel 60 Merck® 7734 (partículas com **0063-0,2 mm, 70-230** mesh ASTM) em hexano. Para a confecção da pastilha, 2,84 g de sílica gel foram impregnadas com 950 mg de resíduo. Como eluente foi empregado hexano e acetato de etila, seguindo uma ordem crescente de polaridade. Primeiramente, foi realizada uma lavagem com 100 mL de hexano, referente a fração 1; em seguida foram eluídos 100 mL da mistura hexano:acetato de etila (95:5), referente a fração 2. A terceira mistura, 150 mL de hexano: acetato de etila (90:10) foi coletada de 20 em 20 mL; a quarta foram 250 mL de hexano:acetato de etila (85:15), recolhida de 20 em 20 mL; a quinta foram 300 mL hexano:acetato de etila (8:2) coletados de 10 em 10 mL; a sexta foram 200 mL de hexano:acetato de etila (7:3) recolhida de 10 em 10 mL; a sétima foram 200 mL de hexano:acetato de etila (5:5) coletada de uma só vez, e por último 200 mL de acetato de etila. Ao fim do experimento, as frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 (1.05554) Merck®, fases móveis variadas e as cromatoplasmas foram reveladas com solução de vanilina sulfúrica, a fim de detectar possíveis terpenoides (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1983; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008).

4.5.2 Perfil cromatográfico dos compostos isolados

4.5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A determinação do perfil cromatográfico, em cromatografia de camada delgada do composto, foi realizada com cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 (1.05554) Merck®; fase móvel hexano:acetato de etila (7:3); desenvolvimento de 15 cm e tempo de 50 min e revelada com solução de vanilina sulfúrica.

4.5.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM)

A CG-EM, para a identificação de compostos isolados do resíduo do óleo essencial de folhas secas foi realizada em espectrômetro Shimadzu GCMS-QP2010Plus, acoplado a um cromatógrafo gasoso GC-2010 equipado com coluna capilar Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25um). Pressão da coluna de 59 kPa; velocidade linear de 36,8 cm/s e fluxo total de 24,4 mL/min. A rampa cromatográfica foi de 60°C a 250°C, a 3°C/min. Injetor em modo splitless a 250°C, interface e fonte de íons a 300°C. Analisando massas entre 40 e 350m/z. Como gás de arraste foi empregado o hélio, a 1mL/min. As amostras foram diluídas em hexano, 1mg/mL, e injetado 1,0 µL. Os componentes do óleo essencial foram identificados através da biblioteca NIST e das indicações de Adams (2007).

4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

4.6.1 Preparo e fracionamento

A preparação do extrato hidroalcoólico e o seu fracionamento foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Moreira (1979), modificada por Nakashima (1993). Os materiais botânicos utilizados foram folhas, caules e cascas do tronco. Para obter os extratos brutos foi utilizada a técnica de maceração a frio. Cada material vegetal foi devidamente fragmentado, sendo que as folhas foram trituradas em processador de alimentos e os caules e cascas do tronco foram fragmentadas com auxílio de um material cortante. Em seguida, 40 g de cada material foram imersos em 200 mL de etanol a 70% (v/v) e acondicionados em frasco âmbar devi-

damente fechado, a temperatura ambiente, durante um período de 15 dias. Após esse período, cada extrato foi filtrado em funil de vidro, com papel de filtro, e os seus volumes foram completados para 200 mL com etanol a 70% (v/v). Com os extratos foram determinadas as características organolépticas: cor, odor, pH e também a análise do teor de sólidos, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988-2005). Posteriormente, os extratos foram colocados em balões de vidro apropriados para a concentração no rotaevaporador, até redução a 1/5 do volume total.

A obtenção das frações foi efetuada por extração líquido/líquido em funil de separação com solventes orgânicos de polaridades crescentes: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. As extrações foram efetuadas com pequenos volumes (10 x 20 mL do solvente extrator). Após cada extração (esgotamento total), as frações tinham seus volumes finais completados com o referente solvente extrator, a 200 mL. O extrato residual foi levado ao banho-maria a 60 °C, até completa evaporação do solvente extrator. Com o extrato livre do solvente efetuou-se nova extração líquido/líquido, até o último solvente selecionado. O extrato final, após a evaporação total do último solvente extrator, no caso o acetato de etila, teve seu volume recomposto a 200 mL com etanol a 70 % e correspondeu à fração hidroalcoólica.

As frações foram acondicionadas em frascos rotulados, devidamente fechados e acondicionados no refrigerador até o momento do seu uso.

4.6.2 Caracterização dos metabólitos

Esse experimento seguiu o proposto por Nakashima (1993). Os bioativos pesquisados e as reações de caracterização utilizadas para detectá-los qualitativamente nas frações obtidas foram: flavonoides (reações de Shinoda, Pacheco, oxalobórica e zinco), leucoantocianidinas (reação com ácido clorídrico fumegante), cumarinas (reação com NaOH-UV), antraquinonas (reação de Bornträger), alcaloides (reações com os reativos de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer) e esteroides e/ou triterpenoides (reação de Liebermann-Burchard).

4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO

4.7.1 Preparo dos extratos aquosos

Os extratos foram preparados a partir de folhas, caules e cascas do tronco de acordo com Moreira (1979) e Nakashima (1993). Os extratos aquosos foram obtidos através da maceração à temperatura moderada. Para isso, 40g de cada material vegetal, já processado, foi imerso em 200 mL de água destilada e levados ao banho-maria a 60°C durante 2 horas. Decorrido o tempo, os extratos foram filtrados em funil de vidro, com papel de filtro, e tiveram seus volumes completados para 200 mL com água destilada. Em seguida foram determinadas as características organolépticas: cor, odor, pH e também a análise do teor de sólidos de cada extrato, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988-2005). Os extratos foram acondicionados em frascos rotulados, devidamente fechados e mantidos no refrigerador até o momento do seu uso.

4.7.2 Caracterização dos metabólitos

Os bioativos pesquisados e as reações de caracterização utilizadas para detectá-los qualitativamente nos extratos aquosos foram: glicosídeos antociânicos (reação de coloração pelo caráter anfotero), glicosídeos cianogênicos (reação com papel picro-sódico), glicosídeos saponínicos (teste de formação de espuma), amino-grupos (reação de ninhidrina), ácidos fixos (reação com reativo de Nessler), ácidos voláteis (detecção em fita pH) e taninos (reação com cloreto férrico, sulfato de ferro amoniacal, solução de gelatina, cloridrato de emetina, cianeto de potássio, dicromato de potássio e ensaio de Staniasny) (NAKASHIMA, 1993).

4.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Esse ensaio, com algumas modificações, foi baseado no proposto por Wang, Lee e Peng (1997), que quantifica os fenóis presentes na amostra através da ocorrência de hidroxilas fenólicas. O método consiste na mensuração da intensidade da cor azul proveniente da redução do reativo de Folin-Ciocalteu (fosfotúngstico-fosfomolibdico) na presença de um álcali, nesse caso, o carbonato de sódio.

O experimento foi realizado com folhas secas, caules e cascas do tronco. Primeiramente foram pesados 8 g de cada material vegetal, devidamente triturado, imersos em 30 mL de uma solução de acetona a 80% e levados para extração durante 1 hora em ultrassom. Decorrido o tempo, os extratos foram filtrados em funil com papel de filtro, tiveram a parte líquida reservada, e a parte sólida sofreu mais 2 extrações, seguindo o mesmo procedimento citado acima. No final das 3 extrações, o volume final de cada extrato foi completado para 100 mL, em balão volumétrico, com a solução de acetona a 80%, originando três soluções mãe (SM), uma para cada material vegetal.

Para as reações foram realizadas diluições das SM, para que as absorvâncias no ultravioleta não fossem muito altas, assim, para a folha seca foram diluídos 5 µL da SM em 8 mL de água destilada; e para o caule e a casca do tronco foram diluídos 5 µL da SM em 6 mL de água destilada.

A metodologia consistiu em misturar 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu com 2 mL da diluição da SM, adicionar 5 mL de solução de carbonato de sódio a 20% (m/v) recém preparada, completar o volume para 10 mL, aguardar 20 minutos e efetuar a leitura no espectrofotômetro UV-VIS em 735 nm (Shimadzu 1601).

O tempo de espera pré-determinado de 20 minutos é devido aos reativos formarem um complexo instável com os compostos fenólicos presentes na amostra. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando como branco a água destilada.

Como substância padrão-referência foi empregado o ácido gálico, para o qual foi elaborada uma curva analítica de calibração nas concentrações de 50 a 300 µg/mL.

4.9 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE FOLHAS

Para esse estudo, foram utilizadas folhas adultas, sendo que para a análise das dimensões do comprimento e largura do limbo foliar foram mensuradas dez folhas e obtida a média dos valores.

Após serem fixadas em FAA 70% (JOHANSEN, 1940) por 48 horas, as folhas foram armazenadas em álcool etílico a 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976), para posterior confecção das lâminas semipermanentes e permanentes.

As lâminas semipermanentes foram obtidas através de secções paradérmicas das faces adaxial e abaxial, realizadas à mão livre com auxílio de uma lâmina

cortante (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Para a coloração, foram utilizados a fucsina básica a 0,0125% (m/v) mais o azul de astra a 1% (m/v) (BRITO; ALQUINI, 1996). A montagem das lâminas foi desenvolvida com glicerina a 50% (v/v) em água destilada, seguindo a lutagem com esmalte de unha incolor.

Para a obtenção das lâminas permanentes, primeiramente o material vegetal em estudo foi submetido a desidratação em série alcoólica crescente, e em seguida foi diafanizado em xilol. A infiltração foi realizada em estufa a 60 °C com parafina (JOHANSEN, 1940).

As secções transversais da porção central do limbo foliar, incluindo a nervura principal, foram obtidas a partir dos blocos parafinados, em micrótomo de rotação Leica RM 2025, com 10 e 12 µm de espessura. As secções foram hidratadas, distendidas nas lâminas e secas em mesa térmica a 40°C. Para a coloração foram empregadas a solução de azul de toluidina a 0,05% (m/v) (SAKAI, 1973) e também, a solução de fucsina básica 0,0125% (m/v) mais azul de astra a 0,5% (m/v) (ROESER, 1972; LUQUE; SOUSA; KRAUS, 1996). O bálsamo do Canadá sintético foi usado como meio de montagem. As fotomicrografias foram obtidas através do fotomicroscópio Olympus CX31, sendo que as escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

A análise ultraestrutural das superfícies adaxial e abaxial da lâmina foliar foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-6360LV, com o referente software para registro de imagens.

Para preservar a organização da cera epicuticular, seguindo o proposto por Brito e Alquini (1996) com algumas modificações, as amostras não foram fixadas em FAA 70, foram apenas secas em dessecador para em seguida serem desidratadas em série etanólica crescente, até etanol absoluto. Em seguida foram realizados o ponto crítico, em aparelho CPD 030 - Critical Point Dryer – BALTEC, e a metalização em ouro, em aparelho SCD 030 - Balzers Union FL9496 – Balzers, do material vegetal, que posteriormente foi encaminhado para análise no microscópio eletrônico (SOUZA, 1998).

4.10 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.10.1 Preparo das frações

Devido à semelhança de metabólitos bioativos encontrados em folhas, caule e casca do tronco, para a avaliação das atividades biológicas foram selecionadas apenas as folhas e as cascas do tronco.

Para a obtenção das frações dos extratos desses materiais vegetais, primeiramente, foram preparados os extratos brutos, através da maceração a frio (preservação dos compostos termolábeis). Para isso, 20 g do material vegetal foram imersos em 150 mL de etanol a 70% (v/v) durante 15 dias. Posteriormente os extratos foram filtrados em filtro de vidro, com papel de filtro, e levados ao rotaevaporador até a secura total sob temperatura controlada de ± 35 °C. Assim, foi procedida a extração sólido/líquido com os seguintes solventes, nessa ordem, hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e água, obtendo-se 5 frações para cada material vegetal. As frações orgânicas foram levadas à secura, evaporando-se os solventes ao ar livre, enquanto que a fração aquosa foi liofilizada. Foi calculado o rendimento obtido para cada fração (ROBARDS, 2003; GLOWNIAK *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2007).

4.10.2 Atividade antioxidante

Para essa análise foram executadas duas técnicas: o método do fosfomolibdênio e do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila - DPPH, seguindo o experimento desenvolvido por Negri, Possamai e Nakashima (2009), com algumas alterações.

4.10.2.1 Método do fosfomolibdênio

A técnica identifica a capacidade antioxidante total das amostras. Ela se baseia na redução do molibdênio (Mo) VI em Mo V, que, em meio ácido e na presença de um agente redutor, forma o complexo de cor verde fosfato/Mo V, o qual tem a intensidade de cor medida no UV-VIS a 695 nm e atribuída ao poder antioxidante total de uma amostra (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Primeiramente, foram preparadas SM, em metanol, de cada fração obtida dos materiais vegetais e do óleo essencial a uma concentração de 200 µg/mL. Posteriormente foram adicionados 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M) a 0,3 mL de SM para cada fração. Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 minutos; após o resfriamento foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu

1601) a 695 nm. O ensaio foi efetuado em triplicata e como branco 0,3 mL de metanol com 3 mL do reativo.

As substâncias-referência utilizadas foram o ácido ascórbico e a rutina, ambos a 200 µg/mL. Como base para o cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante.

Assim, a porcentagem de atividade antioxidante das frações, comparadas com a do ácido ascórbico foi dada através da fórmula:

$$\% \text{ Ativ. antioxidante} = \frac{\text{Absorbância amostra} - \text{absorbância branco}}{\text{absorbância ác. ascórbico} - \text{absorbância branco}} \times 100$$

4.10.2.2 Método DPPH

O método está baseado na utilização do radical DPPH•, um cromóforo muito estável, de cor violeta e absorção máxima em 517 nm. Na presença de substâncias redutoras, como os compostos antioxidantes, ocorre a redução do radical, alterando sua coloração de violeta para amarela, devido ao emparelhamento de seus elétrons, e a absorvidade em 517 nm começa a diminuir. Logo, a intensidade de cor violeta lida no espectrofotômetro será inversamente proporcional à concentração de substâncias redutoras na amostra (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS; CUVILLIER; BERSET, 1995; ARNAO, 2000).

Para o experimento foram preparadas soluções metanólicas das amostras nas concentrações de 0,58 a 300 µg/mL. Em 3 mL, de cada solução teste, foi adicionado 0,1 mL de solução metanólica de DPPH a 1 µM e após 30 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu 1601) a 517 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como branco o metanol e como controle 3 mL de metanol e 0,1 mL de solução de DPPH.

Com os resultados obtidos foi construído um gráfico de % Atividade antioxidante X Concentração em µg/mL, onde a % Atividade antioxidante foi calculada pela fórmula: $\% \text{ Ativ. Antioxidante} = 100 - ((\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco}) / \text{Abs Controle}) \times 100$.

A equação da reta de cada gráfico foi calculada substituindo o valor de y por 50 e foi determinado o IC₅₀. Como substâncias-referência foram empregados o ácido ascórbico, nas concentrações de 0,078 a 5 µg/mL em metanol, e a rutina, nas concentrações de 0,625 a 10 µg/mL em metanol.

4.10.3 Atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição

Nesse experimento foram estabelecidas a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM), apresentadas pelas frações de folhas secas, óleo essencial e composto BAD1, de acordo com o CLSI (2005), com algumas modificações.

Os microrganismos empregados foram: *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

As Figuras 5 a 7 ilustram como as microplacas foram organizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras selecionadas.

Com os materiais do ensaio devidamente esterilizados, foram preparadas soluções-mãe na concentração de 1 mg/mL a partir de todas as amostras, empregando como solvente a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (v/v) em água destilada.

Para o teste com bactérias, utilizando o caldo de Mueller-Hinton, foram processadas diluições seriadas, para resultar em concentrações entre 500 e 1,5 µg/mL das amostras em estudo, distribuídos em 100 µL em cada orifício da microplaca, estéril, de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 5 µL dos inóculos bacterianos, contendo 5×10^5 UFC/mL de cada bactéria, e as placas foram incubadas em aerobiose a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Decorrido o tempo, adicionaram-se 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) (5% v/v) em metanol, à cada cavidade das microplacas utilizadas, que foram levadas para incubação em aerobiose durante 30 min a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, para verificar o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando cloranfenicol, a 30 µg/mL, como antimicrobiano padrão.

No teste com leveduras foi empregado o meio Sabouraud Dextrose, do qual foram processadas diluições seriadas, resultando nas concentrações entre 500 a 1,5 µg/mL das amostras em estudo, distribuídas em 100 µL em cada orifício da microplaca. Posteriormente, foram somados 100 µL de inóculo, com $2,5 \times 10^3$ UFC/mL da levedura testada, e as placas incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

O crescimento dos microrganismos, também, foi analisado adicionando-se 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) e levando as placas para incubação

em aerobiose durante 30 min a $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os testes foram realizados em triplicata, empregando cetoconazol, a $50 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ como padrão.

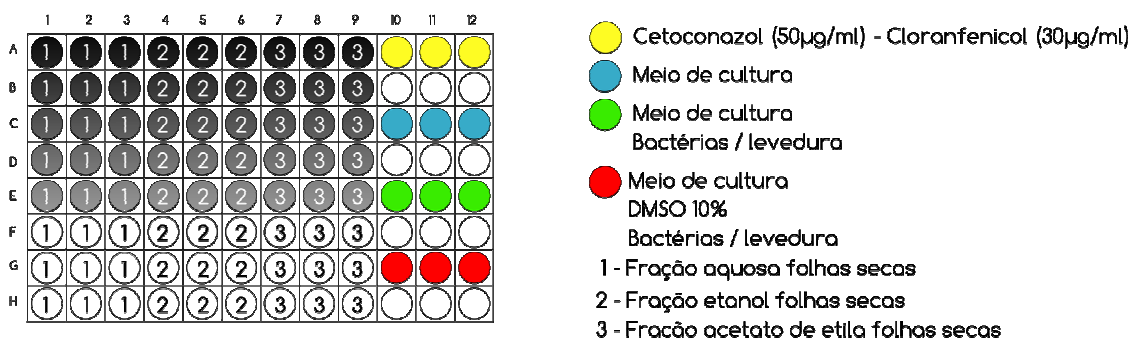


FIGURA 5 - ORGANIZAÇÃO DA MICROPLACA 01 NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

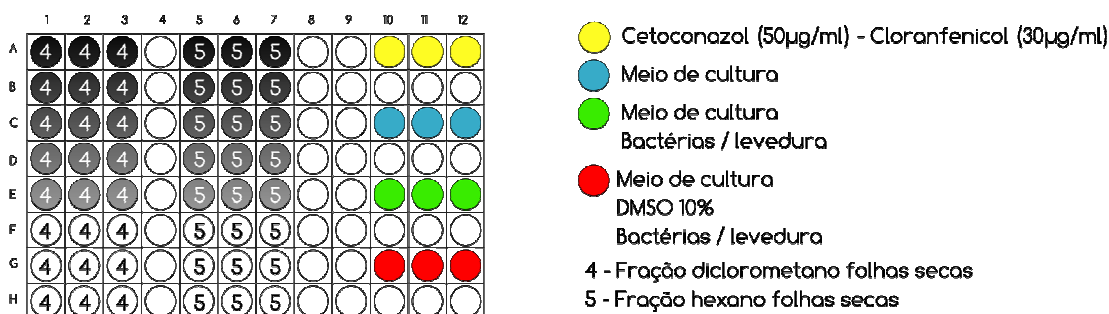


FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO DA MICROPLACA 02 NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

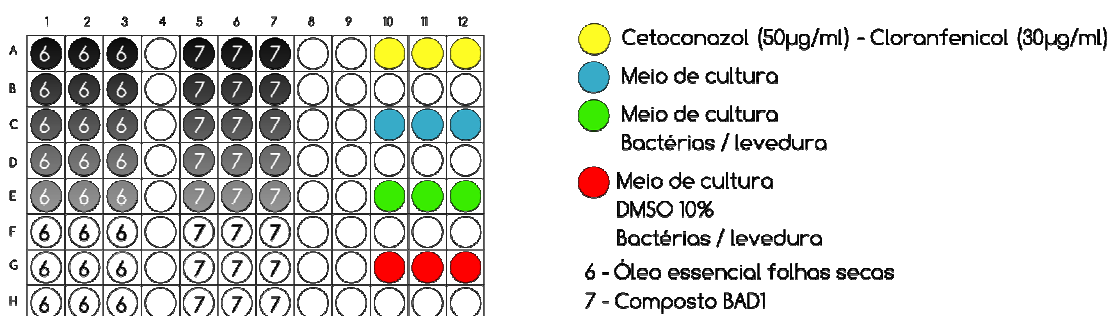


FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO DA MICROPLACA 03 NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para determinar a CIM, foi considerada a menor concentração de agente antimicrobiano que impediu o crescimento dos microrganismos, tanto para as bactérias quanto para a levedura. As amostras que apresentaram valores de CIM menores que $10 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados excelentes; valores entre 10 e $100 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ bons e valores entre 100 e $500 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ atividade moderada. Valores acima de $500 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ são considerados de fraca atividade (MACHADO *et al.*, 2005).

A CBM e a CFM foram avaliadas repicando 10 μ L dos poços que possuíam a CIM e dos poços com as duas concentrações maiores, em placas contendo o meio Mueller-Hinton para as bactérias (incubação de 24 horas a $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e meio Sabouraud-dextrose para a levedura (incubação de 24 horas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A CBM e CFM são aquelas que não apresentam crescimento microbiano visível após a repicagem, indicando a morte de 99,5% dos microrganismos presentes no inóculo. As amostras que demonstrarem crescimento dos microrganismos após a repicagem para o teste de CBM ou CFM foram consideradas com efeito bacteriostático e fungistático, respectivamente (VELJIĆ *et al.*, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS DAS FOLHAS SECAS

No ensaio, as folhas secas apresentaram um teor de substâncias voláteis totais de $12,06 \pm 0,30\%$. Extraíndo a porcentagem de óleo essencial presente nas folhas secas, foi estabelecido o valor de $8,47 \pm 0,15\%$, que corresponde ao teor de umidade presente nas folhas secas. Esse teor está dentro do preconizado em diferentes farmacopeias (Farmacopeia Brasileira, 1988-2005; PHARMACOPEA Helvetica, 1993; MALINOWSKI, 2010).

5.2 ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS

5.2.1 Rendimento de óleo essencial

A Tabela 01 indica os resultados obtidos na determinação do rendimento de óleo essencial, extraído de folhas secas e frescas, durante a estação de inverno, por hidrodestilação com aparato de Clevenger.

TABELA 1- RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *E. badjensis* POR HIDRODESTILAÇÃO

AMOSTRA	RENDIMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL (V/m)
Folhas secas	$4 \pm 0,5$
Folhas frescas	$2,5 \pm 0,1$

No processo de extração, foram observadas algumas características do óleo essencial, como seu aroma intenso e característico, coloração amarelo esverdeado e densidade menor que a da água. Também ficou evidente que, durante as 6 horas de extração, a maior quantidade de óleo foi obtida na primeira hora de hidrodestilação, fato igualmente observado em outras espécies de *Eucalyptus*, como o *E. benthamii*, *E. cinerea*, *E. smithii* e *E. globulus* ssp. *bicostata* (BOSCARDIN, 2009; MALINOWSKI, 2010).

Dentre os dois tipos de amostras utilizados, o que obteve maior rendimento de óleo essencial foi o das folhas secas, $4 \pm 0,5\%$, enquanto que as folhas frescas renderam $2,5 \pm 0,1\%$. A diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato de as folhas secas possuírem uma menor quantidade de umidade, conseqüentemente

menor peso, e assim ser necessária uma maior quantidade de folhas, para alcançar um determinado peso, em relação às folhas frescas. Babu e Singh (2009) propõem outro motivo que explica a diferença obtida, que está ligado a cera epicuticular presente nas folhas frescas, sendo que esta pode levar a uma incompleta hidrodifusão do óleo situado nas glândulas secretoras.

Um estudo desenvolvido por Mantero *et al.* (2007), analisou a potencialidade para a produção de óleo essencial, a partir de folhas frescas, de 9 espécies de eucalipto, dentre elas *E. badjensis*. Nesse estudo, essa espécie obteve o rendimento de $1,25 \pm 0,78\%$, o segundo maior entre as espécies pesquisadas, e segundo os autores, na Austrália, sob as mesmas condições experimentais, exemplares de *E. badjensis* pode alcançar um rendimento 2,8% de óleo essencial. Valores acima dos apresentados por *E. globulus ssp. maidennii*, $1,4 \pm 0,32\%$, *E. viminalis*, $1,23 \pm 0,43\%$, *E. globulus ssp. globulus*, $1,05 \pm 0,48\%$ e *E. bosistoana* F.v.M., 1%.

Na extração de óleos essenciais, a partir de folhas secas, Estanislau *et al.* (2001) determinaram o rendimento de 4% na extração de óleo essencial de *E. citriodora*. Franco (2005) verificou um rendimento de 6,07% de óleo nas folhas secas do *E. cinerea*. Outro bom rendimento foi estabelecido por Malinowski (2010), estudando *E. globulus ssp. bicostata*, onde, a partir de folhas secas colhidas no inverno, obteve o valor de 5,05%.

A flutuação no rendimento de óleo essencial, extraído das folhas de representantes do gênero *Eucalyptus*, é algo muito evidente e conhecido no meio. Essas variações ocorrem, principalmente, devido a fatores ambientais, genéticos e ao tipo e idade das folhas empregadas na extração. Assim, o horário que é realizado a coleta e temperatura, a época do ano, o local e o solo onde são cultivadas as árvores, a idade destas e de suas folhas, são fatores que poderão interferir no rendimento de óleo extraído, por isso devem ser sempre levados em conta (HE; MURRAY; LYONS, 2000).

5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS

A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas do óleo essencial de folhas secas e os valores preconizados pelo ISO 770-1980, que define os as propriedades para óleos de *Eucalyptus globulus*.

5.3.1 Densidade relativa

Como ilustrado na Tabela 2, o óleo extraído apresentou densidade relativa de 0,8973 g/mL. Seguindo o proposto por Guenther (1961), que estabelece uma faixa de 0,91 a 0,93 g/mL a d_{20}^{20} para óleos essenciais medicinais, o óleo extraído das folhas secas de *E. badjensis* não está dentro destas especificações.

Segundo Vitti e Brito (2003), a *International Standard Organization* (ISO) estabeleceu que a densidade relativa de óleos essenciais ricos em citronelal (ISO – 3044), como o extraído de *E.citriodora*, deve estar entre 0,858-0,877 g/mL. Já os óleos essenciais ricos em cineol (ISO – 3065), a densidade relativa desejada está entre 0,906-0,925 g/mL. A ISO 770, determina densidade relativa entre 0,906 e 0.925 g/mL para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*.

TABELA 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS, E OS VALORES PRECONIZADOS PELO ISO 3095-1974

ANÁLISE	RESULTADO	ISO 770-1980
Densidade relativa	0,8973 ± 0,00085 g/mL	0,906 – 0,925
Índice de refração	1,4629	1,4590 – 1,4670
Poder rotatório específico	+10,6653	0 a +10
Solubilidade em etanol 70%	1:3	1:5
80%	1:2	X
90%	1:1	X
Absoluto	1:1	X

X: Não preconizado

5.4 ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Apresentando um índice de refração de 1,4629, o óleo essencial de folhas secas está de acordo com o preconizado por Guenther (1961) para óleos essenciais medicinais, que determina valores entre 1,4600-1,4700 (Tabela 2)

Para óleos essenciais ricos em citronelal, os valores do índice de refração devem estar entre 1,4500-1,4590, e para os ricos em cineol, os valores desejados estão entre 1,4580-1,4650. Para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, os valores devem estar entre 1,4590 e 1,4670 (VITTI; BRITO, 2003).

5.4.1 Poder rotatório específico

De acordo com Vitti e Brito (2003), o poder rotatório específico, a 20 °C, de óleos essenciais, extraídos de espécies de *Eucalyptus*, e ricos em citronelal, deve ser entre -2 e +4, e os ricos em cineol, entre -2 e +2. A ISO 770, determina poder rotatório específico entre 0 e +10 para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. A amostra analisada apresentou um valor de + 10,6653, levemente superior ao determinado pela ISO.

5.4.2 Solubilidade em etanol

O óleo essencial extraído se mostrou totalmente miscível, em qualquer proporção, na solução etanólica a 90% (v/v) e no etanol absoluto. Na concentração de 70% de etanol, o óleo necessitou de 3 volumes para alcançar total solubilização, e em 80%, foram necessários 2 volumes da solução para solubilizar o volume de óleo.

Segundo Guenther (1961), os óleos essenciais classificados como medicinais, quando solubilizados em etanol a 70%, devem apresentar solubilidade na faixa de 2,2 - 11 volumes. Para Vitti e Brito (2003), seguindo a *International Standard Organization* (ISO), os óleos essenciais ricos em citronelal, devem exibir, para o etanol a 80%, solubilidade igual a 1:2, enquanto que os ricos em cineol, para o etanol a 70%, devem apresentar solubilidade de 1:3. Para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, a solubilidade em álcool a 70% deve ser de 1:5 partes.

5.4.3 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

A Tabela 3 exibe os resultados alcançados pela CG-EM do óleo essencial de folhas secas. Nela estão listados os compostos identificados, seus índices de retenção de Kovat's e a porcentagem relativa expressa por cada um. O cromatograma obtido pela cromatografia gasosa está ilustrado na Figura 8.

A CG-EM revelou que os componentes majoritários do óleo essencial de folhas secas são 1,8-cineol (81,17%); α -pineno (8,36%); limoneno (5,61%); e α -terpineol (2,02); que totalizam 97,16% dos compostos presentes no óleo estudado.

TABELA 3 - CRAMOTOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE *E. badjensis*

COMPOSTO	KOVAT'S	PORCENTAGEM RELATIVA (%)
1,8-cineol	1033	81,17
α -pineno	934	8,36
Limoneno	1030	5,61
α -terpineol	1193	2,02
Alo-aromadendreno	1639	0,09
Não identificado	1658	0,76
Não identificado	1661	0,44
TOTAL		98,45

O 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol, $C_{10}H_{18}O$, é considerado um dos monoterpenos oxigenados mais importantes dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* (MERCK INDEX, 1996). Segundo Vitti e Brito (2003), a *International Standard Organization* (ISO) estabelece que os óleos essenciais de eucaliptos, ricos em 1,8-cineol, e indicados para a indústria farmacêutica, devem apresentar entre 80-85% de eucaliptol em sua composição. Entre as atividades biológicas reconhecidas, o 1,8-cineol apresenta ação expectorante, anestésica, antisséptica, antibacteriana, antifúngica, repelente, entre outras (SIMÕES; SPITZER, 2007). No Uruguai, também estudando o óleo essencial de folhas secas de *E. badjensis*, Mantero *et al.* (2007) estabeleceram o teor de 85,95% de 1,8-cineol. Analisando a composição do óleo essencial de espécies de eucalipto, Estanislau *et al.* encontraram 0,93% de eucaliptol em *E. citriodora*; 6,17% em *E. saligna* Sm. ; 86,72% no *E. microcorys* F.v.M.; e 7,74% em *E. grandis*. Em seu estudo, Boscardin (2009) obteve 0,54% de eucaliptol no óleo essencial de folhas secas, coletadas no outono, de *E. benthamii*. Estudando a composição do óleo essencial de folhas secas de *E. globulus* spp. *bicostata*, Malinowski (2010) quantificou 65,34% de 1,8-cineol na amostra coletada no outono.

O monoterpeno α -pineno, $C_{10}H_{16}$, é um dos principais componentes da turpentina, uma oleorresina tóxica extraída de espécies de *Pinus*. Esse monoterpeno é indicado para a manufatura de solventes, plastificantes, inseticidas, cânfora base para perfumes (MERCK INDEX, 1996), e reportada na literatura a atividade antifúngica e antibacteriana do α -pineno (TARAN; GHASEMPOUR; SHIRINPOUR, 2010). Estanislau *et al.* (2001) evidenciaram 0,27% desse monoterpeno no óleo essencial de *E. saligna*. Mantero *et al.* (2007) detectaram o α -pineno no óleo essencial de três espécies de *Eucalyptus*; teor de 3,32 % em *E. globulus* ssp. *bicostata*; 5,86% em *E.*

globulus ssp. *maidennii*; e 7,64% em *E. globulus* ssp. *globulus*. No estudo de Boscardin (2009), com a espécie *E. benthamii*, o óleo essencial alcançou 22,63% de α -pineno, nas folhas coletadas no outono, e 20,84% na amostra de primavera.

O limoneno, $C_{10}H_{16}$, é um monoterpeneo muito encontrado no óleo essencial de frutas cítricas, como laranja, limão e bergamota. Muito empregado na produção de solventes, esse composto apresenta certa toxicidade. De acordo com Sun (2007) esse metabólito é indicado para a dissolução do cálculo biliar, controle da azia e prevenção de muitos tipos de câncer. No óleo essencial de *E. saligna*, Estanislau *et al.* (2001) encontraram 1,91% de limoneno. Na espécie *E. benthamii*, Boscardin (2009) evidenciou no óleo essencial o teor de 1,00%, na amostra de outono, e 1,50% no óleo extraído de folhas coletadas na primavera. Analisando a composição do óleo essencial de cavidades secretoras isoladas de espécies de *Eucalyptus*, Goodger *et al.* (2010) detectaram o limoneno em *E. polybractea* Baker, *E. globulus* e *E. froggattii*.

Outro monoterpeneo oxigenado, o α -terpineol, $C_{10}H_{18}O$, possui atividade antisséptica, antibacteriana, antifúngica e anticâncer (supressora da sinalização NF- κ B) (MERCK INDEX, 1996; HASSAN *et al.*, 2010; TARAN; GHASEMPOUR; SHIRINPOUR, 2010). No estudo desenvolvido por Estanislau *et al.* (2001), foram encontrados 9,25% de α -terpineol no óleo essencial de *E. saligna*; 4,07% em *E. grandis*; 3,90% em *E. microcorys*; e 1,93% em *E. cloeziana*. Goodger *et al.* (2010) evidenciaram a presença de α -terpineol nas cavidades secretoras de *E. polybractea*, *E. globulus* e *E. froggattii*. No óleo essencial de folhas secas de *E. benthamii*, Boscardin (2009) quantificou 1,43% de α -terpineol no outono, e 1,37% na primavera. O óleo essencial de folhas secas de *E. globulus* ssp. *bicostata* analisado por Malinowski (2010), demonstrou o teor de 15,96% desse composto, somente na amostra de outono. Medhi *et al.* (2010) estabeleceram o teor de 1,29% de α -terpineol no óleo essencial de folhas de *E. camaldulensis*.

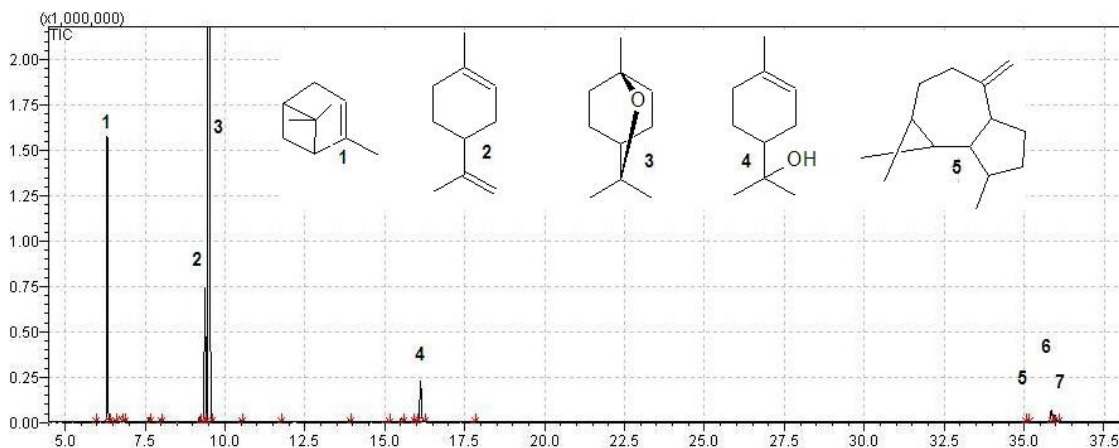


FIGURA 8 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE *E. badjensis*, POR CROMATOGRAFIA GASOSA: 1: α -PINENO, 2: LIMONENO, 3: 1,8-CINEOL, 4: α -TERPINEOL, 5: ALO-AROMADENDRENO, 6 – 7: NÃO IDENTIFICADOS

5.5 COMPOSTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS

5.5.1 Isolamento de compostos

A coluna cromatográfica da substância cristalizada do óleo essencial de folhas secas forneceu o total de 75 frações. Devido aos valores semelhantes de R_f , das frações 4 e 9 estas foram reunidas, apresentando um composto. Após a evaporação do solvente, obteve-se uma substância cristalina de cor branca opaca (ponto de fusão = $67^\circ \pm 1^\circ\text{C}$). A substância apresentou um rendimento de 25,21% (m/m), em relação a massa de precipitado, e foi denominado de BAD1.

5.5.2 Perfil cromatográfico do composto isolado

5.5.2.1 Cromatografia em camada delgada

A CCD do composto BAD1, efetuada em cromatoplaquetas de sílica gel 60 F254 (1.05554) Merck®; fase móvel hexano:acetato de etila (7:3); desenvolvimento de 15 cm com um tempo de 50 min; foi revelada com solução de vanilina sulfúrica a 1%, evidenciando uma mancha de coloração roxa-escura, com $R_f = 0,704$.

5.5.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa

Através da CG-EM foi possível estabelecer que o composto BAD1, isolado do óleo essencial de folhas secas, refere-se a uma mistura de três prováveis sesquiterpenos, com tempo de retenção muito próximo, como mostra a Tabela 4. A Figura 9 ilustra o cromatograma obtido pela CG.

Analisando o espectro do alo-aromadendreno, exibido na Figura 10, é possível reconhecer o peso molecular em torno de 204. Esse valor é confirmado por Barros, Zambarda e Heinzmann (2009), que determinaram a fórmula molecular $C_{15}H_{24}$ para esse composto, isolado do óleo essencial de *Lippia alba* L. (Verbenaceae), pois, somando-se as massas atômicas, encontra-se o valor de 204. O composto alo-aromadendreno foi detectado no óleo essencial de folhas de integrantes da família Myrtaceae, entre eles, algumas espécies de *Eucalyptus* (LOPES, 2008; BOSCARDIN, 2009; GOODGER *et al.*, 2010).

O composto com índice de Kovat's de 1658, de acordo com o espectro ilustrado na Figura 11, possui o peso molecular em torno de 207. Observando o espectro apresentado na Figura 12, é possível reconhecer o peso molecular de 332 para o composto de índice de retenção 1661.

Até o momento, não foi possível estabelecer uma metodologia para a separação das substâncias apresentadas no composto BAD1. Assim, novas tentativas serão realizadas futuramente, para isolar e identificar os dois compostos ainda desconhecidos.

TABELA 4 - CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA DO COMPOSTO BAD1

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO	DE C_n	T_n	KOVAT'S	PORCENTAGEM RELATIVA (%)
Alo-aromadendreno	35,107	17	37,483	1639	9,84
Não identificado	35,867	17	37,483	1658	57,85
Não identificado	35,97	17	37,483	1661	31,31
TOTAL					99

C_n : número de carbonos do alcano posterior, T_n : Tempo de retenção do C_n

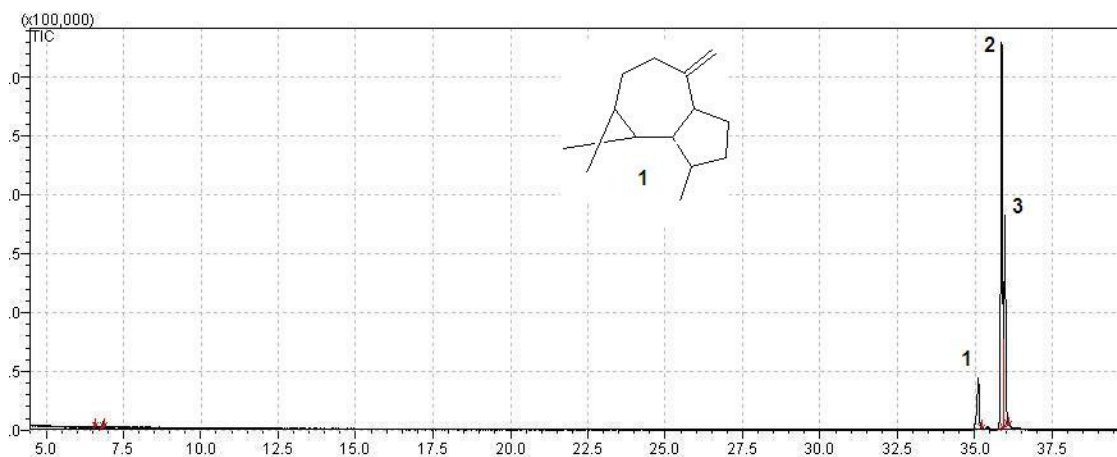


FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO BAD1, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA: 1:ALO-AROMADENDRENO, 2-3: COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS

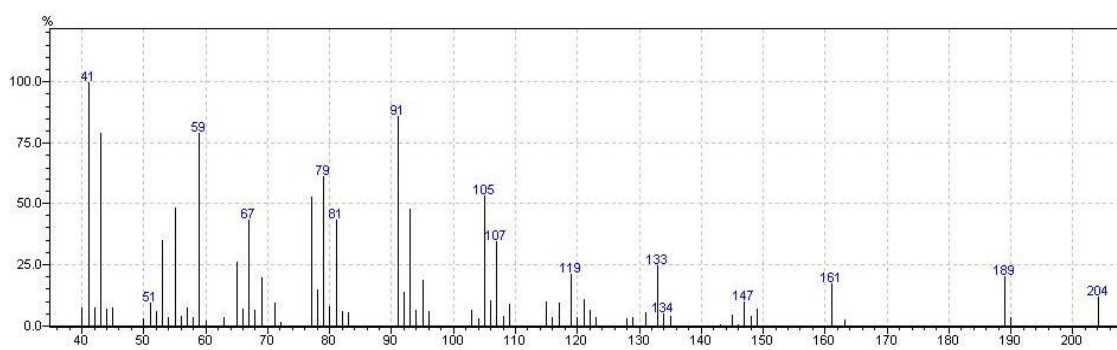


FIGURA 10 - ESPETRO DE MASSAS DO ALO-AROMADENDRENO

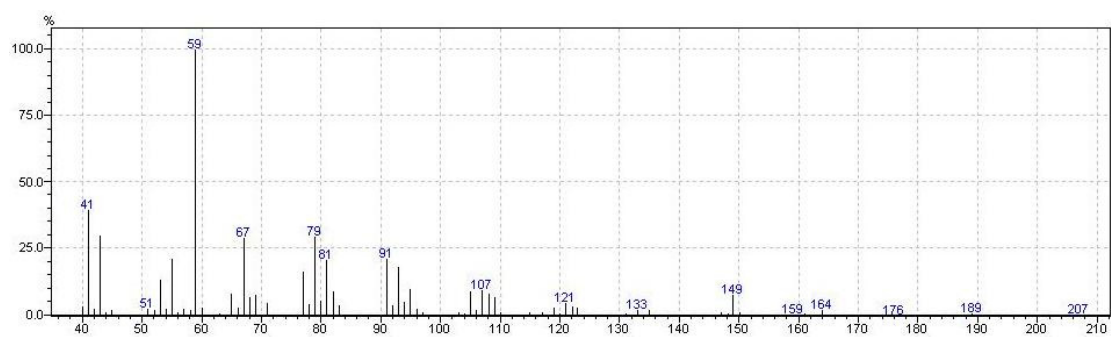


FIGURA 11 - ESPETRO DE MASSAS DO COMPOSTO DE ÍNDICE DE KOVAT'S = 1658

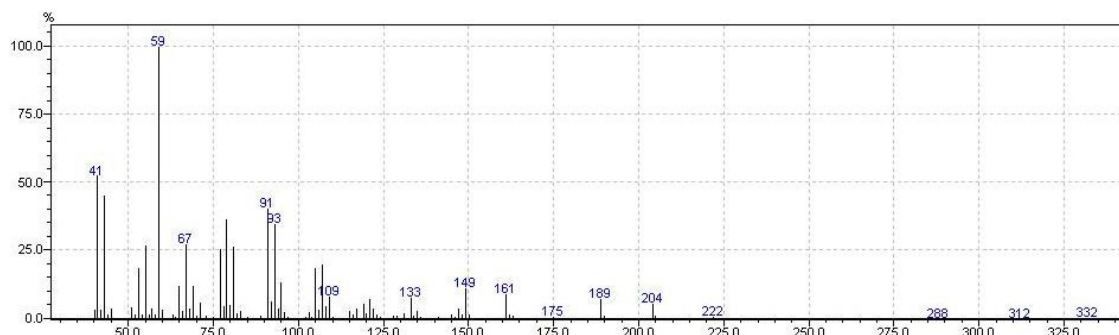


FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO DE ÍNDICE DE KOVAT'S = 1661

5.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

5.6.1 Características Organolépticas

As características organolépticas e o teor de sólidos demonstrados pelos extratos hidroalcoólicos preparados a partir de folhas secas, caules e cascas do tronco estão representados na Tabela 5.

Observou-se que o extrato hidroalcoólico de folhas secas foi o que apresentou a maior porcentagem de sólidos secos, 17,325% (m/m), foi possível estabelecer que esse material vegetal é o que apresenta a maior quantidade de compostos extraíveis com etanol a 70%. O extrato de caules foi de 9,295 % e as cascas do tronco 5,885%.

Tabela 5 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE *E. badjensis*

EXTRATO	COR	ODOR	pH	RESÍDUO SECO (m/m)
Folhas secas	Castanho esverdeado	Aromático	5,0	17,325%
Caules	Castanho claro	Aromático	5,0	9,295%
Cascas do tronco	Castanho escuro	Aromático	5,0	5,885%

5.6.2 Compostos bioativos

Os metabólitos bioativos detectados nos extratos hidroalcoólicos e/ou frações obtidos a partir de folhas secas, caules e cascas do tronco estão expostos na Tabela 6.

Os ensaios fitoquímicos revelaram a presença dos mesmos tipos de metabólitos nos três extratos analisados; foram detectados flavonoides, leucoantocianidinas e esteroides e/ou triterpenos.

Os flavonoides foram analisados através de quatro reações cromáticas, onde as cores obtidas variam de acordo com o núcleo, o número e a posição dos substituintes hidroxilados. É uma importante classe de polifenóis, muito diversificada estruturalmente, relativamente abundante no reino vegetal, principalmente nas angiospermas, e de várias atividades biológicas conhecidas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Esses compostos foram relatados em outras espécies de eucalipto. Em seu estudo, Boscardin (2009), encontrou flavonoides no extrato hidroalcoólico e/ou frações, obtidos a partir das folhas de *Eucalyptus benthamii*. Do mesmo modo, Franco (2005) e Malinowski (2010) revelaram a presença desses metabólitos nas frações dos extratos hidroalcoólicos a 20%, oriundos de folhas secas de *E. cinerea* e *E. globulus ssp. bicostata*, respectivamente. Esses estudos indicam a concordância com os resultados obtidos, na pesquisa de flavonoides, para a espécie *E. badjensis*.

TABELA 6 - BIOATIVOS NOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E/OU FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, CAULES E CASCAS DO TRONCO DE *E. badjensis*

METABÓLITO SECUNDÁRIO	RESULTADOS		
	Folhas secas	Caules	Cascas do Tronco
Alcaloides			
- Reativo de Mayer	Negativo	Negativo	Negativo
- Reativo de Dragendorff	Negativo	Negativo	Negativo
- Reativo de Bouchardat	Negativo	Negativo	Negativo
- Reativo de Bertrand	Negativo	Negativo	Negativo
Flavonoides			
- Reação de Shinoda	Positivo	Positivo	Positivo
- Reação Pacheco	Positivo	Positivo	Positivo
- Reação Oxalo-bórica	Positivo	Positivo	Positivo
- Reação com Zinco	Positivo	Positivo	Positivo
Leucoantocianidinas	Positivo	Positivo	Positivo
Cumarinas	Negativo	Negativo	Negativo
Antraquinonas			
- Reação de Bornträger	Negativo	Negativo	Negativo
Esteroides e/ou Triterpenos			
- Reação de Lieberman-Burchard	Positivo	Positivo	Positivo

Nos extratos foram detectadas leucoantocianidinas, metabólito pertencente à classe dos flavonoides, e que faz parte da biogênese de taninos condensados. Possuem a propriedade de, ao serem aquecidos com ácidos, originarem antocianidi-

nas, de coloração vermelha, a mesma reação utilizada no experimento (COSTA, 2002). Esse resultado condiz com a presença de flavonoides revelada neste estudo.

A existência de esteroides e/ou triterpenoides nos extratos de *E. badjensis* foi revelada pela reação de Lieberman-Burchard. Essa reação indica a presença desses compostos quando ocorre o desenvolvimento de colorações como o amarelo, azul, verde ou rosa (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES *et al.*, 2007). Corresponde a um grande grupo de substâncias complexas, que têm suas estruturas básicas derivadas do esqualeno, C₃₀H₅₀, um hidrocarboneto líquido acíclico. A grande possibilidade de substituições dos grupos funcionais confere a esses metabólitos uma grande variedade de estruturas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Estudando os terpenoides e outros constituintes de *E. globulus*, Santos *et al.* (1997) isolaram alguns triterpenoides, como β-amirina, ácido acetilursólico, ácido acetiloleanólico, ácido acetilbetulínico, eritrodíol, uvaol, entre outros. Analisando as folhas de *Eucalyptus cladocalyx*, Benyahia *et al.* (2005) isolaram o triterpeno clado-calol, ácido ursólico, β-sitosterol e outras cinco ursolactonas. Domingues *et al.* (2011), explorando extratos de cascas de três espécies de eucalipto, *E. urograndis*, *E. grandis* e *E. maidenii*, por cromatografia gasosa, acoplada ao espectro de massa, detectaram como triterpenos majoritários o ácido betulínico, ácido betulônico, β-amirina, β-sitosterol, ácido oleanólico, ácido ursólico e outros derivados.

5.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS AQUOSOS

5.7.1 Características Organolépticas

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos na análise das características organolépticas e o teor de sólidos dos extratos aquosos, derivados de folhas secas, caules e cascas do tronco. A amostra vegetal que teve maior rendimento de extração com água, de acordo com a porcentagem do teor de sólidos secos, foram as folhas secas, com 9,995% (m/m). O extrato oriundo dos caules apresentou 6,505% e o de cascas do tronco, 2,657% do peso inicial.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E TEOR DE SÓLIDOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *E. badjensis*

EXTRATO	COR	ODOR	pH	RESÍDUO SECO (m/m)
Folhas secas	Castanho	Aromático	5,0	9,995%
Caules	Castanho	Aromático	5,0	6,105%
Cascas do tronco	Castanho escuro	Aromático	5,0	2,657%

5.7.2 Compostos presentes nos extratos aquosos

Na análise fitoquímica dos extratos aquosos, obtidos de folhas secas, caules e cascas do tronco, foram detectados glicosídeos saponínicos, ácidos fixos, taninos e aminogrupos. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 8.

TABELA 8 - METABÓLITOS DETECTADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS SECAS, CAULES E CASCAS DO TRONCO DE *E. badjensis*

METABÓLITO SECUNDÁRIO	RESULTADOS		
	Folhas secas	Caules	Cascas do Tronco
Glicosídeos antociânicos	Negativo	Negativo	Negativo
Glicosídeos saponínicos	Positivo	Positivo	Positivo
Glicosídeos cianogênicos	Negativo	Negativo	Negativo
Ácidos voláteis	Negativo	Negativo	Negativo
Ácidos fixos	Positivo	Positivo	Positivo
Taninos:			
- Reação com cloreto férrico	Positivo	Positivo	Positivo
- Reação com sulfato de ferro amoniacal	Positivo	Positivo	Positivo
- Reação com gelatina 2,5%	Positivo	Positivo	Negativo
- Reação com cloridrato de emetina	Positivo	Positivo	Negativo
- Reação com cianeto de potássio	Negativo	Negativo	Negativo
- Reação com dicromato de potássio	Positivo	Positivo	Negativo
- Reação de Staniasny:			
Taninos Hidrolisáveis	Positivo	Positivo	Positivo
Taninos Condensados	Positivo	Positivo	Positivo
Aminogrupos	Positivo	Positivo	Positivo

Glicosídeos saponínicos, ou saponinas, são compostos que apresentam em suas estruturas uma parte hidrofílica, representada por um ou mais açúcares, e outra hidrofóbica, constituída por esteroides ou terpenos policíclicos. Essa característica estrutural é que confere a capacidade, desses metabólitos, em diminuir a tensão superficial da água e apresentar ação detergente e emulsificante. Quando presentes em solução aquosa, e sofrem agitação, as saponinas formam espuma abundante e persistente, porém, a espuma formada é estável mesmo em ácidos minerais

diluídos, o que as difere dos sabões comuns. Esses compostos podem agir sobre membranas biológicas, como a ação hemolítica, e formar complexos com esteroides, motivo pelo quais essas substâncias frequentemente demonstram atividade antifúngica e hipocolesterolemizante (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). O desenvolvimento de espuma, persistente, abundante e estável a ácidos minerais diluídos, nos extratos aquosos comprova a presença de glicosídeos saponínicos. Esses metabólitos já foram detectados em outras espécies de *Eucalyptus* (FABROWSKI, 2002; FRANCO, 2005; BOSCARDIN, 2009, MALINOWSKI, 2010).

O ensaio para pesquisa de ácidos fixos, com reativo de Nessler, confirmou a presença de ácidos de alto ponto de ebulição, capazes de fixar a amônia, levando ao desenvolvimento da coloração marrom após a aplicação do reativo (NAKASHIMA, 1993). Alguns autores evidenciaram esses metabólitos em extratos aquosos de outras espécies de eucalipto (FABROWSKI, 2002; FRANCO, 2005; BOSCARDIN, 2009, MALINOWSKI, 2010).

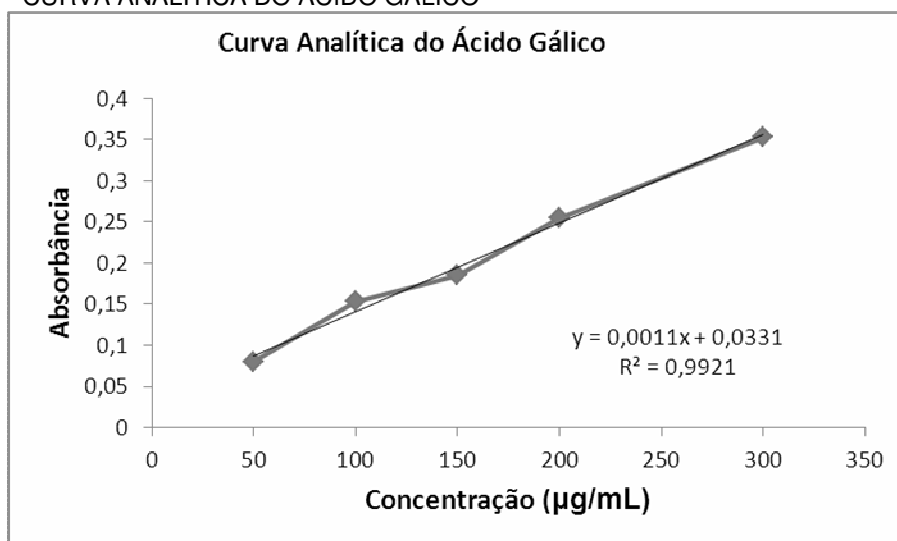
As três amostras vegetais analisados demonstraram taninos em suas composições. Para a detecção desses compostos foram empregados ensaios fundamentados na complexação de taninos com proteínas e alcaloides, oxidação de taninos, precipitação por um sal metálico e colorimetria. O ensaio realizado com cianeto de potássio apresentou resultado negativo nas três análises. De acordo com Costa (2002), o cianeto de potássio reconhece somente o ácido gálico livre, produzindo coloração vermelha; com o ácido gálico combinado a reação é negativa ou muito fraca. As cascas do tronco obtiveram resultado negativo para algumas reações (reação com gelatina 2,5%, reação com cloridrato de emetina, reação com dicromato de potássio e reação com cianeto de potássio), motivo que pode estar ligado ao perfil ou concentração de taninos nessa parte da planta. Segundo Costa (2002), os taninos hidrolisáveis e condensados estão dispostos em todas as regiões da planta, mas com o predomínio de um deles em algumas áreas. O autor também relata que a concentração de taninos varia de acordo com o órgão (folhas, raízes, cascas), a idade (cascas de galhos novos ou idosos, camadas internas ou externas do lenho) e o estado de desenvolvimento (frutos verdes ou maduros). A presença de taninos é amplamente reconhecida em representantes da família Myrtaceae, como em várias espécies de *Eucalyptus* (SANTOS; WATERMAN, 2001; AMAKURA *et al.*, 2002; COSTA, 2002; FABROWSKI, 2002; FRANCO, 2005; BOSCARDIN, 2009, MALINOWSKI, 2010).

O desenvolvimento da coloração azul-violácea, no ensaio para aminogrupos, revela a existência de aminoácidos e/ou compostos derivados, com exceção da prolina e hidroxiprolina, que desenvolvem coloração amarela (NAKASHIMA, 1993). Esses compostos foram encontrados em outros taxa de *Eucalyptus*, como *E. smithii*, *E. cinerea*, *E. benthamii* e *E. globulus* spp. *bicostata* (FABROWSKI, 2002; FRANCO, 2005; BOSCARDIN, 2009, MALINOWSKI, 2010).

5.8 FENÓLICOS TOTAIS

O teor de fenólicos totais presente nas amostras foi expresso em mg em equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de material vegetal (MV). A equação da reta foi obtida através dos dados da curva analítica do ácido gálico (padrão referência), apresentada no Gráfico 1. Substituindo o y, da equação da reta, pelo valor de absorbância apresentado pela amostra obteve-se a concentração de compostos fenólicos totais.

GRÁFICO 1 - CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO GÁLICO



Os resultados encontrados na quantificação dos compostos fenólicos presentes nas folhas secas, caules e cascas do tronco de *E. badjensis*, expressos em mg EAG/g amostras, estão expostos na Tabela 9.

As folhas secas apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, $602,3633 \pm 10,6277$ mg EAG/g MV, os caules $387,7843 \pm 7,3674$ mg EAG/g MV e as cascas do tronco $129,9067 \pm 8,8219$ mg EAG/g MV.

TABELA 9 - FENÓLICOS TOTAIS DE FOLHAS SECAS, CAULES E CASCAS DO TRONCO DE *E. badjensis*

AMOSTRA	FENÓIS TOTAIS (mg EAG/g MV)
Folhas secas	654,3633 ± 21,6277
Caules	487,7843 ± 10,3674
Cascas do tronco	129,9067 ± 19,8219

Amakura *et al.* (2002), estudando a atividade antioxidante e os compostos presentes em um extrato comercial de eucalipto, usado como aditivo alimentar, encontraram o valor de 11,9 mg EAG/ g extrato. Analisando os componentes fenólicos de vários extratos de cascas de *Eucalyptus globulus*, Vásquez *et al.* (2008) verificaram o maior valor, 22,3 g EAG/100 g extrato seco, no extrato obtido em etanol a 50%. Cruz, Domínguez e Parajó (2005) analisaram o teor de fenólicos de um extrato de madeira moída de *E. globulus* utilizando acetato de etila, e detectaram 1,04 g EAG/ 100g de extrato seco. E, Almeida *et al.* (2009) exibiram o valor de 311 ± 20 mg EAG/ g amostra, de compostos fenólicos em extrato aquoso de folhas de *E. globulus*. No estudo realizado por Malinowski (2010), foi determinado o valor de 118,35 ± 8,65 mg EAG/g MV de fenólicos totais nas folhas secas de *E. globulus* ssp. *bicostata*.

As diferentes concentrações de compostos fenólicos encontradas nas amostras estudadas, como também entre as espécies de *Eucalyptus*, podem ser explicadas seguindo o proposto por Santos (2007). De acordo com o autor, a origem dos metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação; onde cada processo é dirigido por genes e influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia e ambiente. Porém, a maioria dos mecanismos reguladores dos processos de biossíntese, estocagem e degradação ainda permanecem desconhecidas. Em muitas espécies, a rota da biossíntese dos metabólitos secundários é restrita a um órgão, enquanto que aqueles são acumulados em todo o vegetal ou em determinados órgãos, providos de um sistema de transporte intracelular. Os metabólitos mais hidrofílicos tendem a ser armazenados em vacúolos, enquanto que os hidrofóbicos se aglomeram em ductos de células mortas, ou aderem-se aos componentes lipofílicos da célula, como membranas, ceras cuticulares e lignina. Completando, Gobbo-Neto e Lopes (2007) propõem que a idade e o desenvolvimento vegetal, bem como seus diferentes órgãos, são fatores que podem influenciar na quantidade de metabólitos secundários produzidos e/ou, a proporção relativa dos componentes da mistura. Os autores também

relatam que tecidos mais jovens de um vegetal apresentam maior produção de metabólitos secundários, entre eles os compostos fenólicos, fator que pode explicar a baixa concentração destes nas cascas do tronco.

5.9 MORFOANATOMIA DE FOLHAS

A análise morfológica das folhas adultas de *E. badjensis* revelou um tamanho foliar médio de $14,31 \pm 0,95$ cm de comprimento por $1,1 \pm 0,32$ cm de largura, disposição alterna, limbo íntegro de contorno falciforme, base simétrica cuneata, ápice agudo, margem inteira, nervação do tipo penínérvea com nervura abaxial de maior saliência, superfícies lisas e glabras, concolores e de consistência papirácea; características que condizem com o relatado na literatura para o gênero *Eucalyptus* (OLIVEIRA; AKISUE, 1997; NISKOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 1998).

Estômatos anomocíticos se fazem presentes nas faces adaxial e abaxial caracterizando a folha como anfiestomática (Figuras 13 e 14). A epiderme é constituída de células de formato poliédrico, levemente arredondadas. Sabe-se, que na família Myrtaceae, geralmente são encontrados estômatos anomocíticos ou paracíticos, presentes tanto na face adaxial quanto abaxial (SOLEREDER, 1908; METCALFE; CHALK, 1950). Entre as espécies de *Eugenia* foram encontrados os dois tipos de estômatos, porém, dentre as espécies de *Eucalyptus*, é mais comum a ocorrência de estômatos anomocíticos, que podem estar presentes em uma ou ambas as faces (BOSCARDIN, 2009).

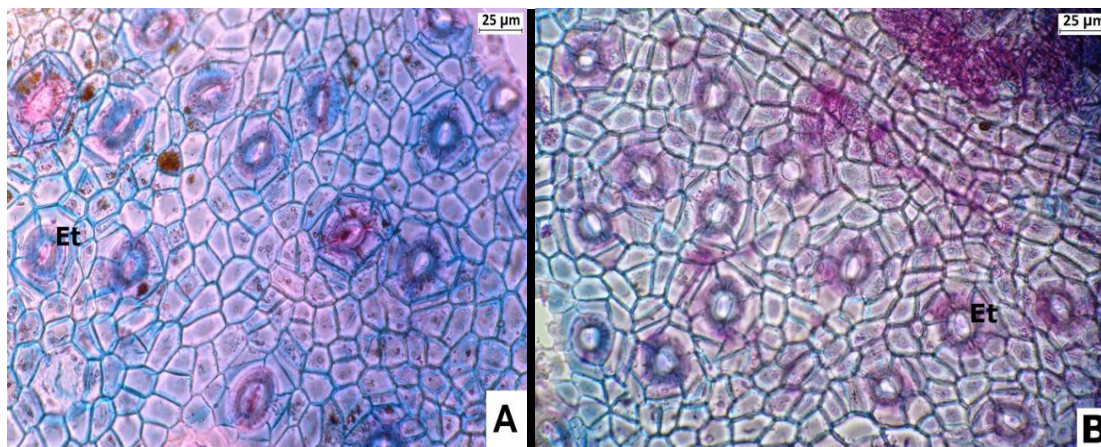


FIGURA 13 - SECÇÕES PARADÉRMICAS DA FOLHA: A - FACE ADAXIAL. B - FACE ABAXIAL. ET: ESTÔMATO (MICROSCOPIA FOTÔNICA = MF)

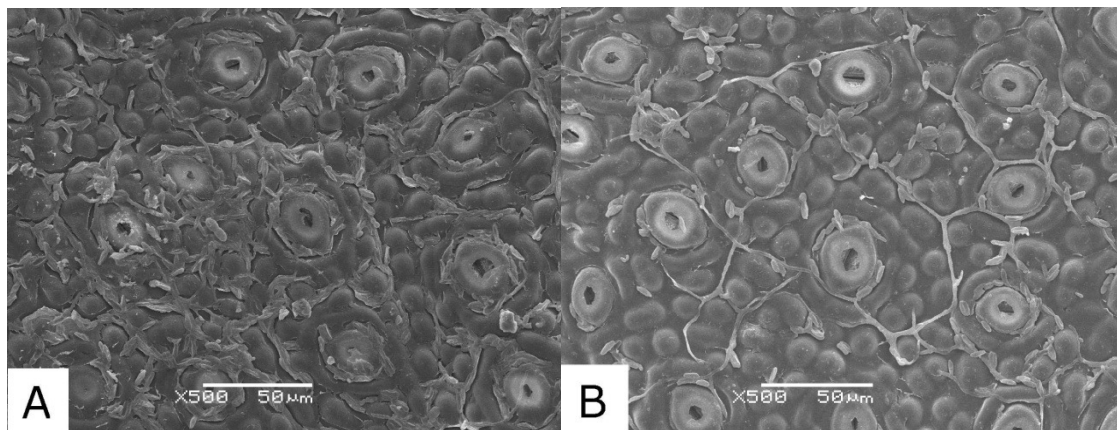


FIGURA 14 - SUPERFÍCIE FOLIAR REVELANDO OS ESTÔMATOS: A - FACE ADAXIAL. B- FACE ABAXIAL (MEV).

Na Figura 16, é observada a cutícula espessa, tanto na face adaxial quanto abaxial, bem como epiderme uniestratificada, cujas células possuem formato poliédrico e de mesma espessura em ambas as faces, estômatos estão situados no mesmo nível das demais células da epiderme. O mesofilo foliar pôde ser classificado como isobilateral (heterogêneo simétrico), formado por parênquima clorofiliano paliçádico e parênquima clorofiliano lacunoso, organizados com cerca de 1-3 e 2-4 estratos celulares, respectivamente. Cavidades secretoras se mostraram presentes abaixo da epiderme e distribuídas ao longo de todo o mesofilo. Idioblastos com cristais de oxalato de cálcio (Figura 17B) em forma de drusas e prismas se fazem presentes ao redor de feixes vasculares e nas bordas do limbo.

Nas duas faces do limbo há presença de súber cicatricial (Figuras 15, 16 e 17A). Esse tipo de estrutura, já observada em outras taxa de *Eucalyptus*, como em *E. benthamii* e *E. globulus* Labill., está relacionado com a função de evitar a perda excessiva de água e de outros componentes voláteis da planta, sendo uma característica de grande importância na análise morfoanatômica de vegetais da família Myrtaceae (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998; BOSCARDIN, 2009).

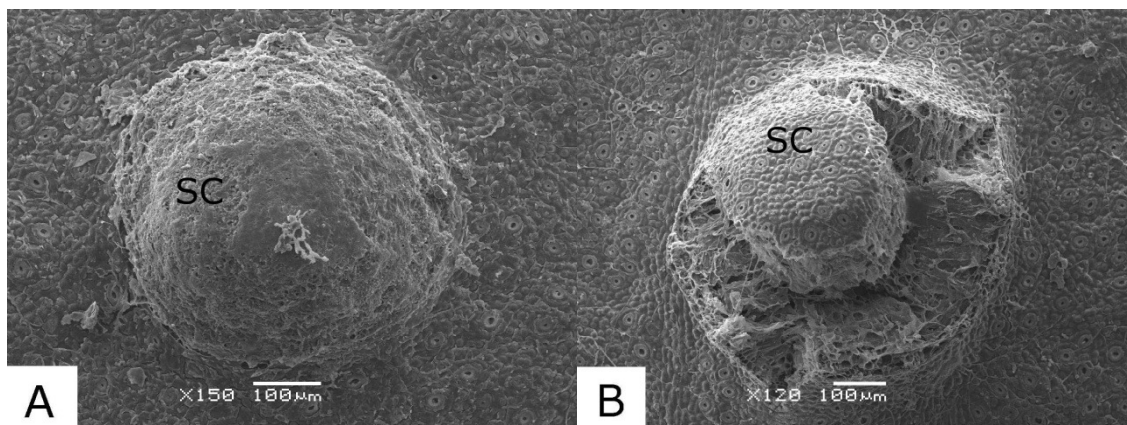


FIGURA 15- EPIDERME REVELANDO SÚBER CICATRICIAL: A - FACE ADAXIAL. B - FACE ABA-
XIAL. SC: SÚBER CICATRICIAL (MEV).

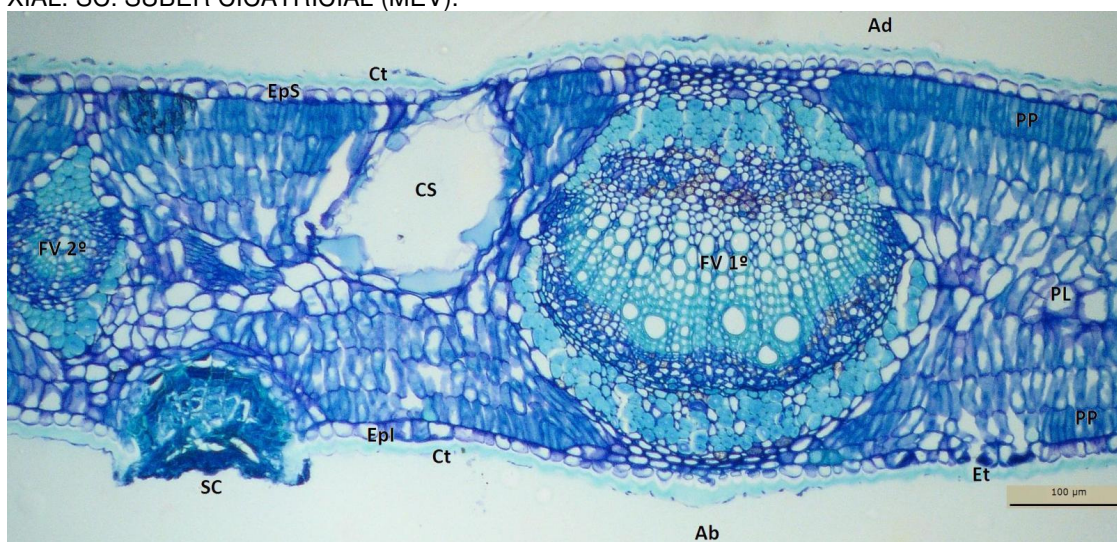


FIGURA 16 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA. ET: ESTÔMATO, Ab: FACE ABA-
XIAL, CT: CU-
TÍCULA, Epi: EPIDERME INFERIOR, SC: SÚBER CICATRICIAL, PP: PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO,
PL: PARÊNQUIMA LACUNOSO, FV 1º: FEIXE VASCULAR DE MAIOR PORTE, FV 2º: FEIXE VAS-
CULAR DE MÉDIO PORTE, CS: CAVIDADE SECRETORA, EpS: EPIDERME SUPERIOR, Ad: FACE
ADAXIAL (MF).

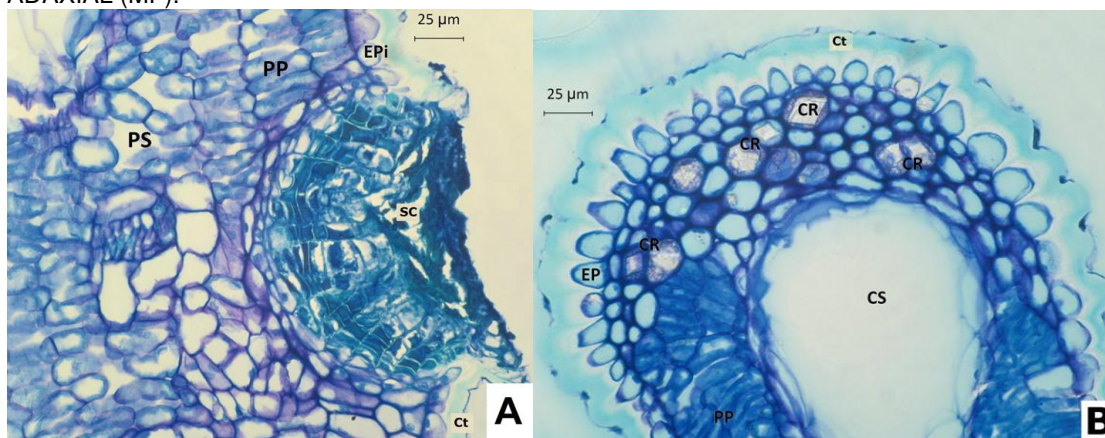


FIGURA 17 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA. A- SÚBER CICATRICIAL EM DETALHE. B- IDIOBLASTOS
COM CRISTAIS EM DETALHE. CT: CUTÍCULA, EPI: EPIDERME INFERIOR, SC: SÚBER CICATRICIAL, PP:
PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, PS: PARÊNQUIMA LACUNOSO, CS: CAVIDADE SECRETORA, EP: EPIDERME,
CR: IDIOBLASTO COM CRISTAL DE OXALATO DE CÁLCIO (MF).

A presença de cutícula, geralmente composta de material gorduroso ou cutina, em ambas as faces da folha da espécie em estudo, pode ser justificada como uma proteção contra a transpiração excessiva e ataque de microrganismos (FABROWSKI, 2002). As cavidades secretoras, preenchidas de material lipofílico, são muito frequentes dentre os representantes da família Myrtaceae, entre eles *Eucalyptus*, estando presente na maioria das espécies deste (SIMÕES *et al.*, 2007). Na família Myrtaceae, é comum encontrar idioblastos com cristais de oxalato de cálcio nas folhas, geralmente na forma de drusas, sozinhos ou agrupados, sendo que a presença desses cristais ao redor do sistema vascular é algo observado em várias espécies de *Eucalyptus* (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2008b; MALINOWSKI, 2009).

Alguns autores relatam que o mesofilo isobilateral é o mais comum entre as espécies de *Eucalyptus*, principalmente nas folhas jovens. Mas o mesofilo do tipo heterogêneo simétrico, constituído por parênquima clorofiliano paliçádico nas duas faces e parênquima clorofiliano lacunoso no centro, já pôde ser observado em outras espécies de *Eucalyptus*, como nas folhas de *E. smithii*, *E. camaldulensis*, *E. globulus* ssp. *globulus* e *E. globulus* (JOHNSON, 1926; JAMES; SMITH; VOGELMANN, 1999; FABROWSKI, 2002; TANTAWY, 2004; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2008a; MALINOWSKI, 2009)

O sistema vascular (Figuras 16 e 18), do tipo bicolateral em arco aberto, tendo a nervura um contorno plano-convexo, adaxial-abaxial respectivamente. Os feixes vasculares de médio e pequeno porte, em sua maioria, também possuem configuração bicolateral, ou seja, o xilema está situado entre duas camadas de floema, uma externa e outra interna. Abaixo da cutícula, da epiderme e do colênquima, foi observada a bainha esclerenquimática bem pronunciada, composta por cerca de 3 a 6 estratos celulares. Igualmente foi observada a presença de inúmeros idioblastos com cristais de oxalato de cálcio na região dos feixes vasculares.

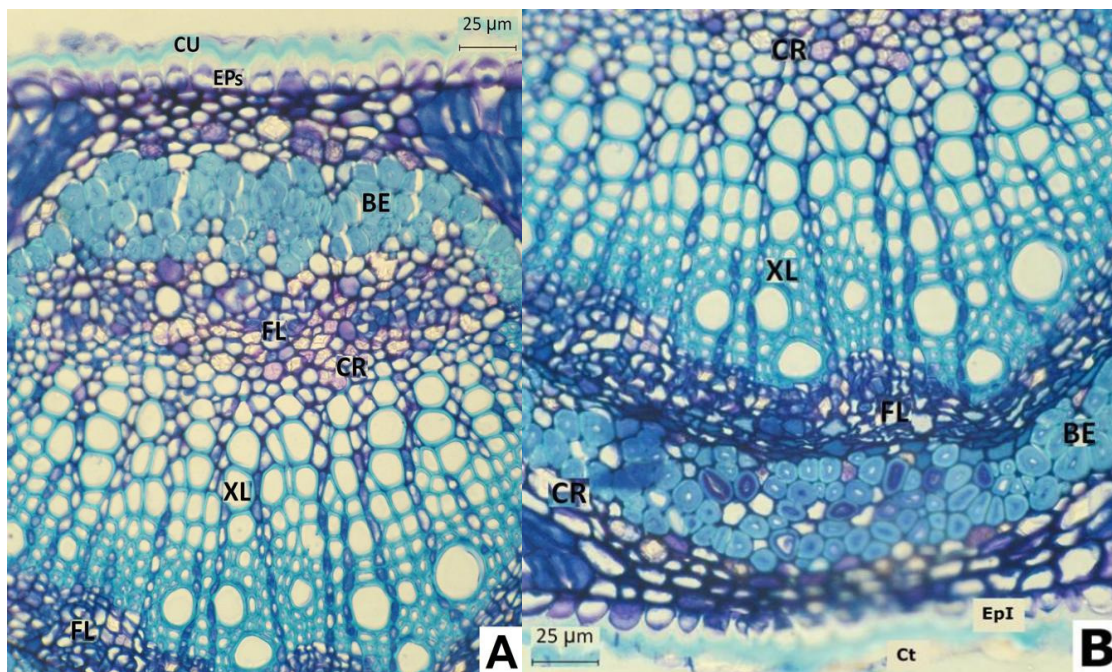


FIGURA 18 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA MOSTRANDO O FEIXE VASCULAR DE GRANDE PORTE EM DETALHE. A- PARTE SUPERIOR DO FEIXE. B- PARTE INFERIOR DO FEIXE. CU: CUTÍCULA, EPs: EPIDERME SUPERIOR, BE: BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, FL: FLOEMA, XL: XILEMA, EpI: EPIDERME INFERIOR, CR: CRISTAIS (MF).

Estudos demonstram a tendência de vários taxa de eucalipto em apresentarem feixes vasculares biclaterais na nervura mediana, dentre eles *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. pilularis* Sm., *E. pyrocarpa* L.A.S. Johnson & Blaxell, *E. resinifera* Smith in J. White, *E. saligna* Sm., *E. urophylla* S. T. Blake, *E. benthamii* Maiden et Cambage e *E. globulus* Labill. ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat., sendo que as variações ocorrem, principalmente, na disposição vascular das espécies, e que idioblastos com cristais de oxalato de cálcio são comumente encontrados nessa região (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2008b; BOSCARDIN, 2009; MALINOWSKI, 2009). A disposição em arco aberto pode ser observada entre as espécies *E. grandis* W. Hill ex Maiden, *E. pellita* F. Muell., *E. pilularis* Sm. e *E. urophylla* S. T. Blake. Do mesmo modo, foi observado que os feixes vasculares secundários de médio e pequeno porte tendem a ser biclaterais, porém o floema presente na face adaxial pode não estar completamente desenvolvido, fazendo que alguns feixes sejam colaterais (FABROWSKI, 2002; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2008a).

O aspecto da cera epicuticular (Figura 19) em estudo pode ser observado através da microscopia eletrônica de varredura, sendo que apresentou um aspecto liso, com leves estriações. A cera epicuticular pode demonstrar vários tipos de orga-

nização, podendo ser lisa, formada por placas, escamas ou estar coberta por partículas chamadas cristalóides, onde a última é a mais comumente encontrada nos taxa de eucalipto (METCALFE; CHALK, 1950; BARTHLOTT *et al*, 1998, ENSIKAT *et al*, 2006). Em alguns taxa, como a subespécie *E. globulus* Labill. ssp. *bicostata*, é possível observar diferenças quanto a ceras da face adaxial e abaxial. Nesse caso, na face adaxial foi evidenciada cera epicuticular do tipo cristalóide filamentosa, enquanto que na face abaxial ocorreu cera cristalóide do tipo túbulo (MALINOWSKI, 2009). Outras espécies podem apresentar maior concentração de cera em uma das faces, como na face abaxial da subespécie *E. globulus* ssp. *pseudoglobulus* e das folhas jovens de *E. globulus* Labill ssp. *bicostata* (STEINBAUER; SCHIESTL; DAVIES, 2004; MALINOWSKI, 2009).

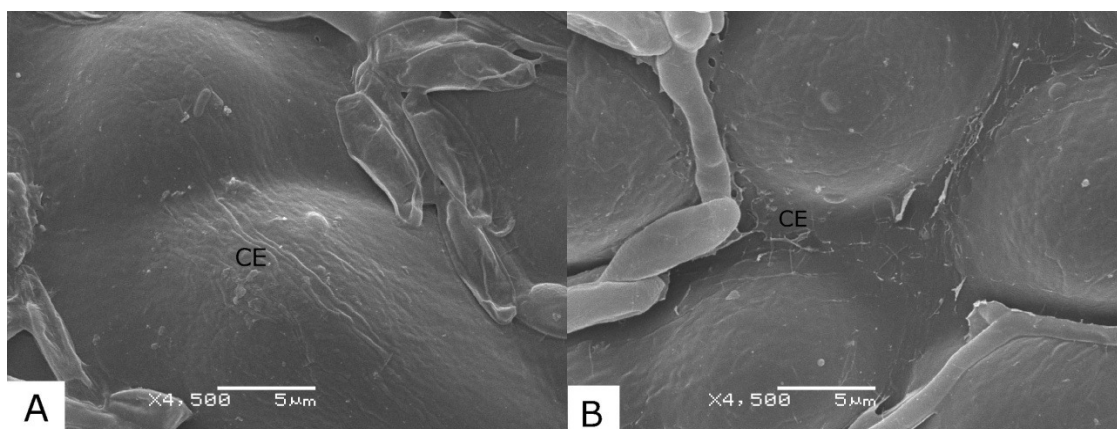


FIGURA 19 - SUPERFÍCIE FOLIAR REVELANDO CERA EPICUTICULAR: A- FACE ADAXIAL. B- FACE ABAXIAL. CE: CERA EPICUTICULAR (MEV).

5.10 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As amostras selecionadas para determinação de atividades biológicas a serem testadas foram as frações obtidas das folhas secas (aquosa, etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano), as frações obtidas das cascas do tronco (aquosa, etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano), o óleo essencial de folhas secas e o composto BAD1.

5.10.1 Rendimentos das frações

Os rendimentos apresentados pelas frações obtidas das folhas secas e cascas do tronco são exibidos na Tabela 10.

As frações hexânicas de ambas amostras vegetais estudados foram as que apresentaram menor rendimento, 0,0625% para as folhas secas, e 0,155% para as cascas do tronco. Esse resultado demonstra que as cascas do tronco possuem maior quantidade de compostos extraíveis com o solvente hexano, quando comparadas às folhas secas. Sabendo que o hexano é solvente apolar, presume-se que as cascas do tronco apresentam maior quantidade de compostos lipofílicos.

As frações obtidas com diclorometano exibiram bons rendimentos em ambas amostras vegetais. A maior porcentagem exibida nas folhas secas pode ser explicada pela presença da clorofila, substância solúvel nesse solvente.

TABELA 10 - RENDIMENTOS APRESENTADOS DAS FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS E CASCAS DO TRONCO DE *E. badjensis*

FRAÇÃO	RENDIMENTO % (m/m MV)	
	Folhas secas	Cascas do tronco
Hexano	0,0625	0,1550
Diclorometano	9,2750	2,3615
Acetato de etila	1,5200	0,9925
Etanol	1,3355	1,8885
Água	25,0575	0,2940

O elevado rendimento apresentado na fração aquosa das folhas secas pode indicar uma elevada concentração de compostos hidrofílicos nesse órgão vegetal. Devido ao alto teor de compostos fenólicos revelados nas folhas secas e sabendo que estes metabólitos possuem alta polaridade, pressupõe-se que esse rendimento está relacionado a esses compostos.

As outras diferenças apresentadas nos rendimentos das frações podem ser explicadas pela variedade de compostos biossintetizados pela planta e também pelo modo de como são estocados no vegetal (SANTOS, 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

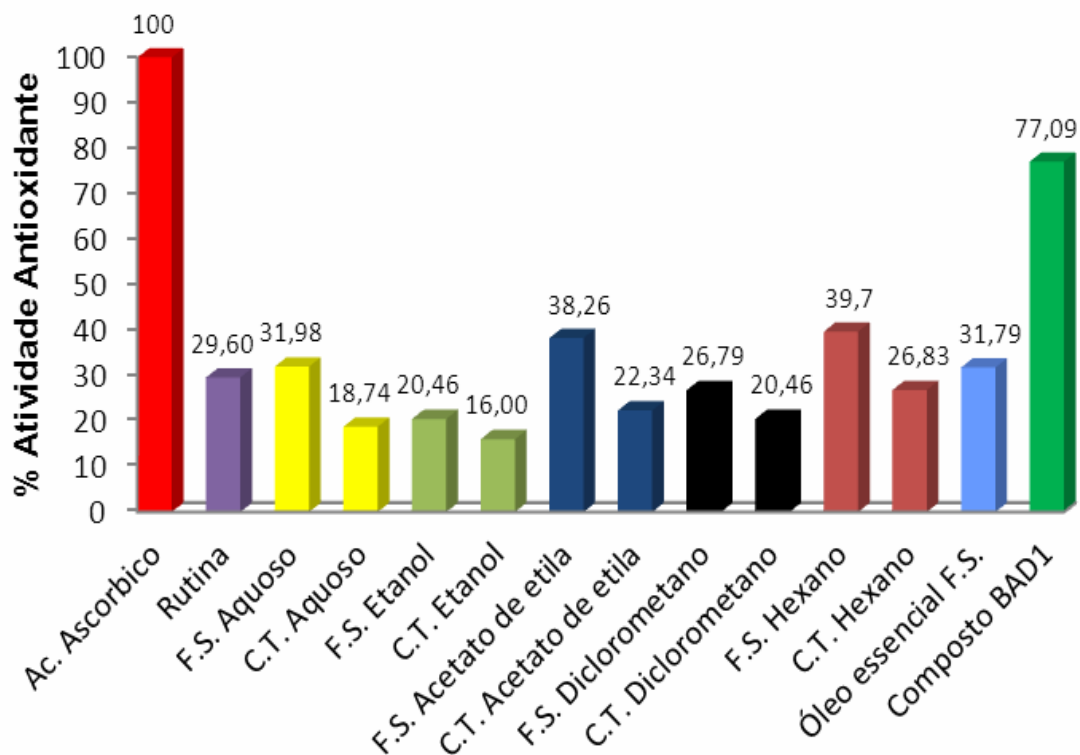
5.10.2 Atividade antioxidante

5.10.2.1 Método do fosfomolibdênio

O Gráfico 2 apresenta as atividades antioxidantes, expressas em porcentagem, reveladas pelo óleo essencial, composto BAD1, frações obtidas das folhas

secas e cascas do tronco e pelos padrões-referência rutina e ácido ascórbico. Para comparar as atividades, o ácido ascórbico foi definido como substância referência com 100% de atividade antioxidante.

GRÁFICO 2 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO E À RUTINA PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO



F.S.: Frações de folhas secas, C.T.: Frações de cascas do tronco.

Os resultados obtidos revelam que nenhuma amostra testada apresentou capacidade maior que a do ácido ascórbico em reduzir o complexo fosfomolibdênico. A amostra que demonstrou o melhor resultado foi o composto BAD1, $77,09 \pm 1,57\%$ de atividade antioxidante relativa à substância referência, o ácido ascórbico.

Comparadas à atividade apresentada pela rutina, $29,60 \pm 1,56\%$, as amostras que revelaram superior capacidade antioxidante foram: fração aquosa de folhas secas, $31,98 \pm 0,88\%$, fração acetato de etila de folhas secas, $38,26 \pm 1,37\%$, fração hexano de folhas secas $39,7 \pm 0,49\%$, óleo essencial de folhas secas, $31,79 \pm 1,08\%$ e o resíduo do óleo essencial. A rutina é largamente utilizada como padrão referência, é um flavonoide de ação antioxidante muito bem reconhecido. Assim, podem-se considerar relevantes os resultados exibidos por essas amostras.

É perceptível que o ensaio do fosfomolibdênio não evidencia apenas a atividade antioxidante de compostos fenólicos, mas a capacidade antioxidante total de uma amostra. Nos experimentos realizados foram observados resultados significativos para os extratos lipofílicos e os hidrofílicos. Esse detalhe pode justificar o fato de o composto BAD1, seguido da fração acetato de etila de folhas secas e fração hexano de folhas secas terem apresentado as maiores porcentagens de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico. Essas considerações também explicam a relevante capacidade em reduzir o complexo fosfomolibdênio, exibida pelo óleo essencial, substância geralmente formada por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, e que dificilmente apresentam mais de uma hidroxila (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A fração aquosa de cascas do tronco exibiu $18,74 \pm 0,92\%$; a fração etanol das folhas secas, $20,46 \pm 1,16\%$; a fração etanol de cascas do tronco, $16,00 \pm 0,67\%$; a fração acetato de etila de cascas do tronco, $22,34 \pm 0,57\%$; a fração diclorometano de folhas secas, $26,79 \pm 0,81\%$; a fração diclorometano de cascas do tronco, $20,76 \pm 0,32\%$; e a fração hexano de cascas do tronco, $26,83 \pm 0,86\%$.

Analisando os resultados exibidos pelas frações obtidas de folhas secas e cascas do tronco, fica evidente que as frações obtidas de folhas secas demonstraram ação antioxidante maior do que as obtidas das cascas do tronco, isso somente quando comparadas entre si, entre as duas frações obtidas de cada solvente empregado. Essa particularidade pode ser explicada pelo fato de as folhas apresentarem maior taxa de biossíntese de metabólitos bioativos e maior concentração destes. Essas características puderam ser comprovadas nos experimentos de teor de resíduo seco, do extrato hidroalcoólico a 70% de folhas secas, e na determinação de compostos fenólicos totais, onde as folhas secas evidenciaram valores superiores em ambos os ensaios.

No estudo realizado por Boscardin (2009), o óleo essencial extraído de folhas secas de *E. benthamii* demonstrou $43,15 \pm 1,08\%$ de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico, na redução do complexo fosfomolibdênio. Malinowski (2010), estudando *E. globulus* ssp. *bicostata*, evidenciou, sob as mesmas condições experimentais, $25,72 \pm 0,38\%$ de atividade para o óleo essencial de folhas secas, $23,27 \pm 0,44\%$ para o extrato etanólico de folhas secas e $24,17 \pm 0,69\%$ para o extrato hidroalcoólico a 70% de folhas secas.

5.10.2.2 Método DPPH

As curvas analíticas obtidas das amostras que tiveram suas atividades antioxidantes testadas frente ao radical DPPH, e das substâncias utilizadas como padrão-referência, o ácido ascórbico e a rutina, estão expostas nos Gráficos 3 a 16. Através deles foram obtidas as equações de reta, onde, substituindo y por 50, foram obtidos os valores de EC₅₀ (µg/mL), quantidade necessária para reduzir 50% dos radicais DPPH, para cada amostra.

A Tabela 11 apresenta os valores de EC₅₀ alcançados pelas amostras e substâncias referência no ensaio antioxidante pelo método DPPH.

A amostra que apresentou a melhor atividade nesse experimento, logo, o menor EC₅₀, foi a fração aquosa das folhas secas, $5,55 \pm 0,65$ µg/mL, seguida da fração aquosa das cascas do tronco, $8,32 \pm 0,39$ µg/mL, e da fração acetato de etila de folhas secas, $11,71 \pm 0,75$ µg/mL. Entre as substâncias empregadas como referência, o ácido ascórbico apresentou EC₅₀ de $0,81 \pm 0,00$ µg/mL, e a rutina, $5,76 \pm 0,25$ µg/mL.

A menor atividade foi demonstrada pelo composto BAD1, $4150,743 \pm 76,58$ µg/mL, seguido do óleo essencial de folhas secas, $576,57 \pm 6,58$ µg/mL, e da fração hexano de cascas do tronco, $428,77 \pm 8,83$ µg/mL.

A fração etanol de folhas secas exibiu $16,88 \pm 1,91$; fração etanol de cascas do tronco $81,55 \pm 1,82$; fração acetato de etila de cascas do tronco, $67,21 \pm 2,00$; fração diclorometano de folhas secas, $134,99 \pm 1,79$; fração diclorometano de cascas do tronco, $308,63 \pm 5,82$; e a fração hexano de folhas secas, $355,44 \pm 2,55$.

De acordo com Boscardin (2009), o método que emprega o radical DPPH é indicado apenas para analisar a atividade antioxidante de compostos que são capazes de transferir elétrons para o DPPH, como os poli-hidroxi-aromáticos, glutatiônica, tocoferol, aminas aromáticas, cisteína e ácido ascórbico. Isto porque esse radical não possui capacidade redox suficiente para ser reduzido pela glucose ou por substâncias aromáticas, que contêm somente uma hidroxila. Assim, segundo Duarte-Almeida *et al.* (2006), o método avalia somente o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes.

GRÁFICO 3 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO AQUOSA DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH

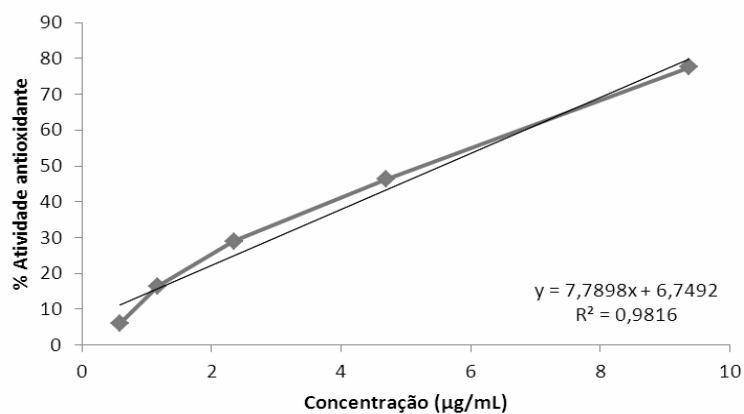


GRÁFICO 4 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO AQUOSA DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH

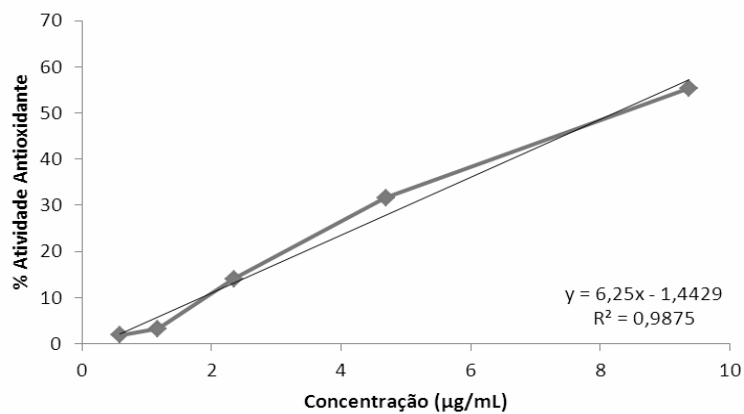


GRÁFICO 5 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ETANOL DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH

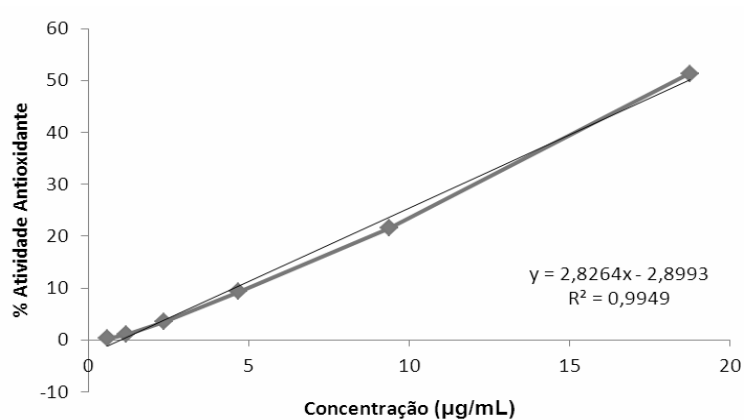


GRÁFICO 6 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ETANOL DE CAS-CAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH

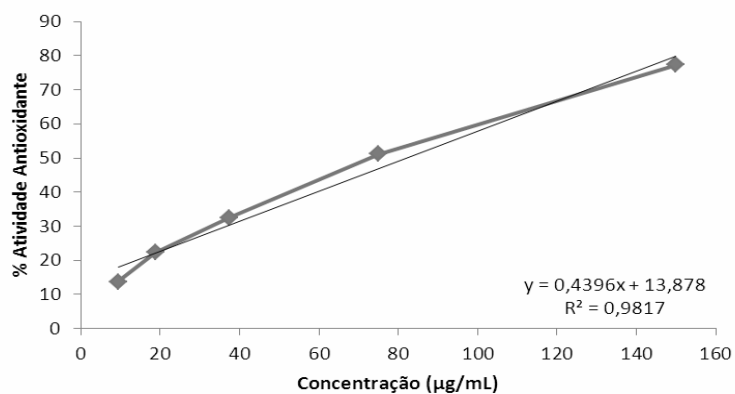


GRÁFICO 7 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH

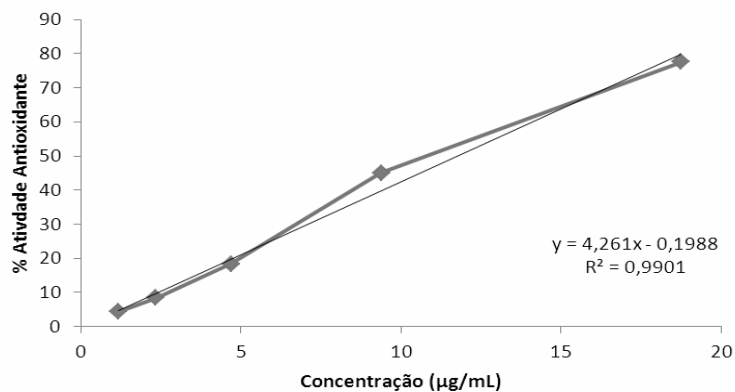


GRÁFICO 8 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH

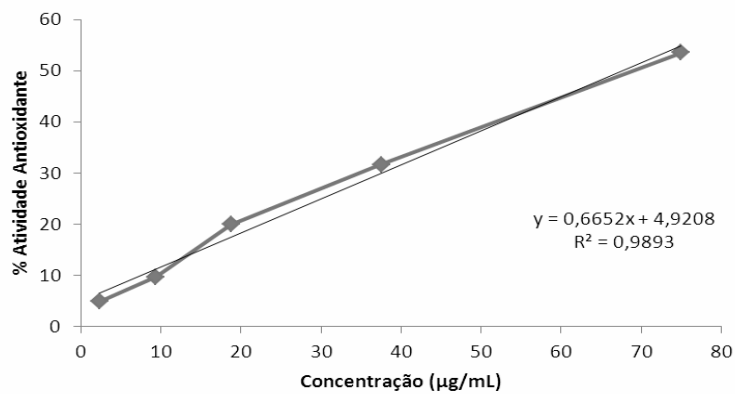


GRÁFICO 9 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH

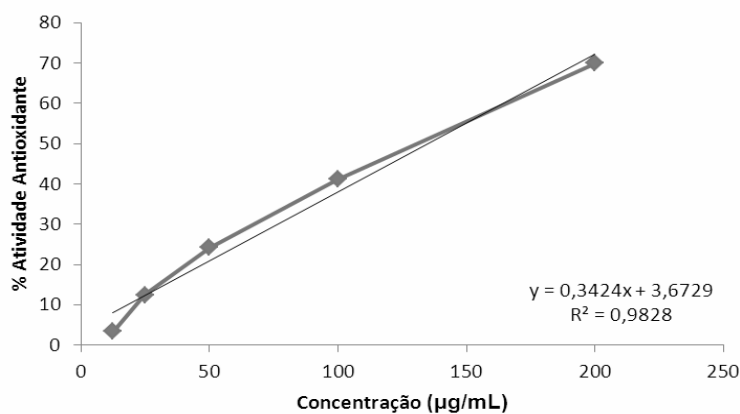


GRÁFICO 10 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH

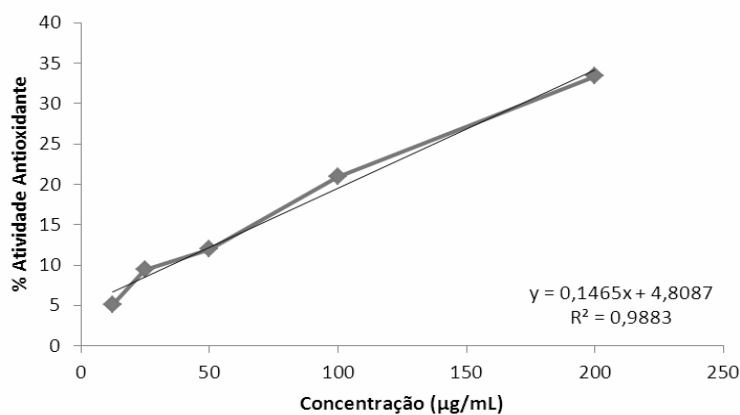


GRÁFICO 11 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH

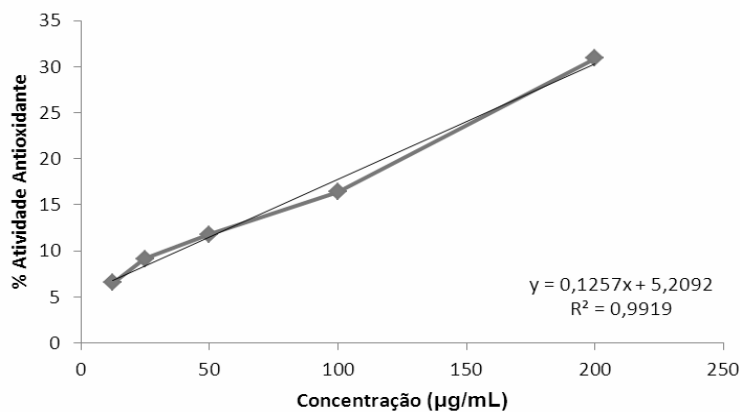


GRÁFICO 12 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO HEXANO DE CASCAS DO TRONCO, PELO MÉTODO DPPH

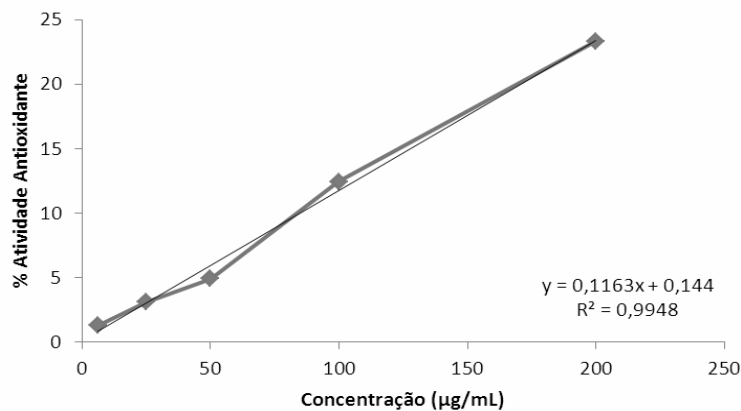


GRÁFICO 13 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS, PELO MÉTODO DPPH

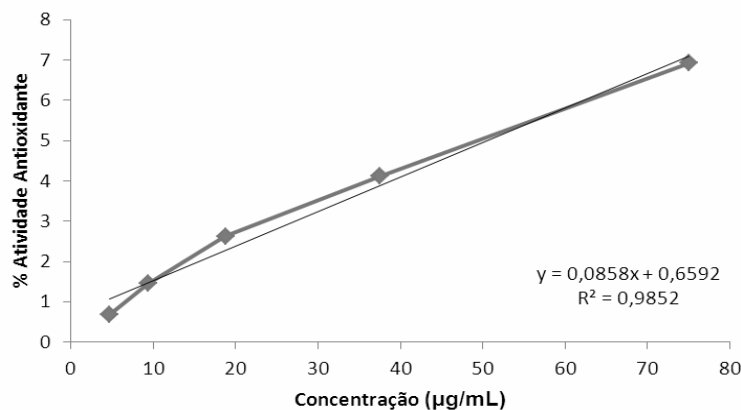


GRÁFICO 14 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO COMPOSTO BAD1, PELO MÉTODO DPPH

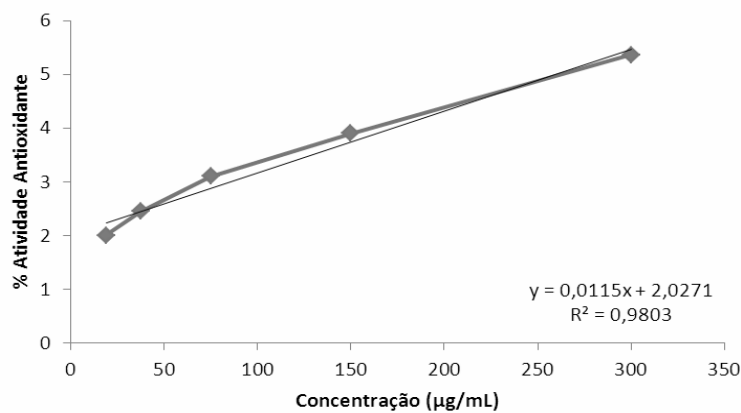


GRÁFICO 15 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO, PELO MÉTODO DPPH

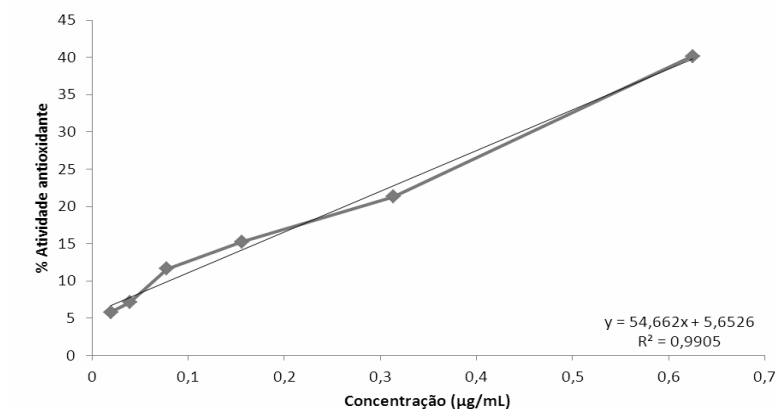
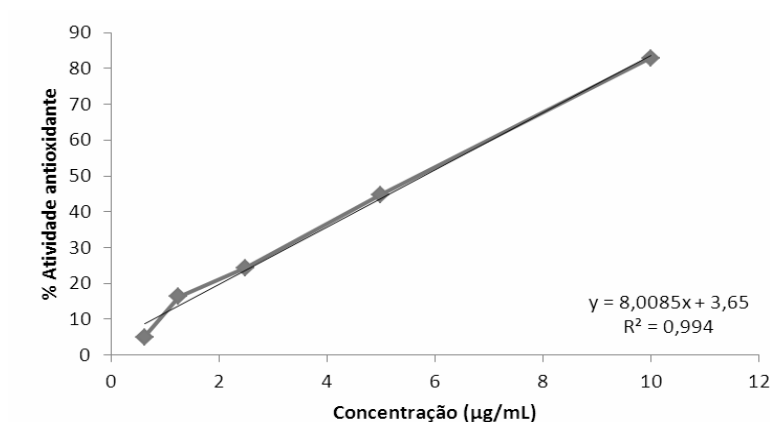


GRÁFICO 16 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA RUTINA, PELO MÉTODO DPPH



Essa discussão permite justificar a diferença no perfil dos resultados, quando comparados com os obtidos no método do fosfomolibdênio. Também fica clara a razão dos resultados revelados pelas frações aquosas de folhas secas e cascas do tronco, e pela fração acetato de etila de folhas secas, uma vez que, esses solventes apresentam alta a média polaridade e logo conseguem extrair compostos poli-hidroxi-aromáticos, como os polifenóis, que foram detectados na análise fitoquímica preliminar de *E. badjensis*.

TABELA 11 - EC₅₀ DAS AMOSTRAS E SUBSTÂNCIAS REFERÊNCIA NO ENSAIO ANTIOXIDANTE DO DPPH

AMOSTRA	EC ₅₀ (µg/mL)
Frações das folhas secas	
Aquosa	5,55 ± 0,65
Etanol	16,88 ± 1,91
Acetato de etila	11,71 ± 0,75
Diclorometano	134,99 ± 3,82
Hexano	355,44 ± 4,55
Frações das Cascas do tronco	
Aquosa	8,32 ± 0,39
Etanol	81,55 ± 1,82
Acetato de etila	67,21 ± 2,00
Diclorometano	308,63 ± 5,82
Hexano	428,77 ± 8,83
Óleo essencial de folhas secas	576,57 ± 6,58
Composto BAD1	4150,743 ± 76,58
Ácido ascórbico	0,81 ± 0,00
Rutina	5,76 ± 0,25

Amakura *et al.* (2002), analisando atividade antioxidante de um extrato comercial de folhas de *Eucalyptus* e suas frações, pelo método DPPH, observaram os seguintes resultados: a fração hexano apresentou EC₅₀ de 430 µg/mL; fração acetato de etila 110 µg/mL; e a fração *n*-butanol 280 µg/mL. No estudo de Boscardin (2009), o óleo essencial de folhas secas de *E. benthamii*, rico em compostos como α-pineno, *p*-cimeno, γ-terpineno e globulol, obteve o EC₅₀ para o radical DPPH no valor de 3,21 ± 0,22 mg/mL. O estudo sobre a atividade antioxidante, frente ao radical DPPH, do óleo essencial e extrato metanólico de folhas secas de *E. globulus* ssp. *bicostata*, realizado por Malinowski (2010), demonstrou EC₅₀ maior que 6 mg/mL para o óleo e 2,95 µg/mL para o extrato. Os compostos majoritários encontrados no óleo extraído no inverno foram o 1,8-cineol, acetato de α-terpineol e o cariofileno.

5.10.3 Atividade antimicrobiana - método da microdiluição

Devido aos resultados pouco promissores apresentados pelos extratos e frações de cascas do tronco, foi decidido estudar apenas a atividade antimicrobiana das frações de folhas secas, do óleo essencial de folhas secas e do composto BAD1.

Nos experimentos realizados por microdiluição, o crescimento bacteriano foi avaliado pela adição do reagente TTC. Nos poços onde as amostras não apresentaram ação antimicrobiana, ocorreu a formação da coloração vermelha. Essa coloração se deve à reação do TTC com os íons hidrogênio formados durante a respiração celular, e que origina uma substância vermelha e insolúvel, conhecida como formazam, indicando a presença de bactérias viáveis no meio (JOHNSON *et al.*, 1985; RAHMAN *et al.*, 2004). As Tabelas 12 a 16 expõem as CIM e CBM/CFM alcançadas pelas amostras e controles, frente aos microrganismos testados.

A fração aquosa de folhas secas de *E. badjensis* foi a única amostra a apresentar ação bacteriostática e bactericida frente a *Proteus mirabilis*, obtendo CIM = 125 µg/mL e CBM = 500 µg/mL. O óleo essencial e o composto BAD1 não revelaram nenhuma atividade contra *Proteus mirabilis* nas concentrações avaliadas.

Na avaliação da atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, a fração aquosa de folhas secas foi a única amostra a obter ação bacteriostática e bactericida, com CIM = 125 µg/mL e CBM = 500 µg/mL. Nas concentrações testadas, não foi alcançado nenhum tipo de atividade antimicrobiana pela fração etanol, óleo essencial e composto BAD1.

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE *Eucalyptus badjensis* FRENTE A *Proteus mirabilis*, MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

MICROORGANISMO/AMOSTRA	RESULTADOS	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Proteus mirabilis</i>		
F. aquosa de folhas secas	125	500
F. etanol de folhas secas	500	NAA
F. acetato de etila de folhas secas	500	NAA
F. diclorometano de folhas secas	500	NAA
F. hexano de folhas secas	250	NAA
Óleo essencial de folhas secas	NAA	NAA
Composto BAD1	NAA	NAA
Cloranfenicol	30	30

NAA: Não apresentou atividade bacteriostática ou bactericida nas concentrações testadas, F.: Fração

TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE *Eucalyptus badjensis* FRENTE A *Escherichia coli*, MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

MICROORGANISMO/AMOSTRA	RESULTADOS	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>		
F. aquosa de folhas secas	125	500
F. etanol de folhas secas	NAA	NAA
F. acetato de etila de folhas secas	500	NAA
F. diclorometano de folhas secas	125	NAA
F. hexano de folhas secas	125	NAA
Óleo essencial de folhas secas	NAA	NAA
Composto BAD1	NAA	NAA
Cloranfenicol	30	30

NAA: Não apresentou atividade bacteriostática ou bactericida nas concentrações testadas, F.: Fração

A fração aquosa demonstrou atividade poder bacteriostático e bactericida frente a *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM = 125 µg/mL e CBM = 250 µg/mL. A fração etanol de folhas secas, o óleo essencial e o composto BAD1 não revelaram nenhuma atividade contra *P. aeruginosa* nas concentrações avaliadas.

TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE *Eucalyptus badjensis* FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*, MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

MICROORGANISMO/AMOSTRA	RESULTADOS	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
F. aquosa de folhas secas	125	250
F. etanol de folhas secas	NAA	NAA
F. acetato de etila de folhas secas	500	NAA
F. diclorometano de folhas secas	250	NAA
F. hexano de folhas secas	500	NAA
Óleo essencial de folhas secas	NAA	NAA
Composto BAD1	NAA	NAA
Cloranfenicol	30	30

NAA: Não apresentou atividade bacteriostática ou bactericida nas concentrações testadas, F.: Fração

Frente a *Staphylococcus epidermidis*, a fração aquosa de folhas secas apresentou CIM = 62,5 µg/mL e CBM = 250 µg/mL; fração etanol CIM = 62,5 µg/mL e CBM = 500 µg/mL; fração acetato de etila CIM = 31,25 µg/mL e CBM = 500 µg/mL; fração diclorometano demonstrou apenas ação bacteriostática, com CIM = 15,625 µg/mL; fração hexano CIM = 31,25 µg/mL e CBM = 500 µg/mL. O óleo essencial e o

composto BAD1 não exibiram atividades antimicrobianas frente a *S. epidermidis* nas concentrações avaliadas.

No experimento realizado com a levedura *Candida albicans*, as amostras avaliadas apresentaram somente atividade fungistática, CIM = 500 µg/mL, com exceção da fração etanol, que não obteve nenhuma atividade nas concentrações empregadas.

TABELA 15 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE *Eucalyptus badjensis* FRENTE A *Staphylococcus epidermidis*, MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

MICROORGANISMO/AMOSTRA	RESULTADOS	
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
F. aquosa de folhas secas	62,5	250
F. etanol de folhas secas	62,5	500
F. acetato de etila de folhas secas	31,25	500
F. diclorometano de folhas secas	15,625	NAA
F. hexano de folhas secas	31,25	500
Óleo essencial de folhas secas	NAA	NAA
Composto BAD1	NAA	NAA
Cloranfenicol	30	30

NAA: Não apresentou atividade bacteriostática ou bactericida nas concentrações testadas, F.: Fração

TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA: CONTROLE E FRAÇÕES DE FOLHAS SECAS, ÓLEO ESSENCIAL E COMPOSTO BAD1 DE *Eucalyptus badjensis* FRENTE A *Candida albicans*, MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

MICROORGANISMO/AMOSTRA	RESULTADOS	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>		
F. aquosa de folhas secas	500	NAA
F. etanol de folhas secas	NAA	NAA
F. acetato de etila de folhas secas	500	NAA
F. diclorometano de folhas secas	500	NAA
F. hexano de folhas secas	500	NAA
Óleo essencial de folhas secas	500	NAA
Composto BAD1	500	NAA
Cetoconazol	50	50

NAA: Não apresentou atividade bacteriostática ou bactericida nas concentrações testadas, F.: Fração

Para a classificação das atividades antimicrobianas alcançadas pelas amostras, este trabalho seguiu o proposto por Machado *et al.* (2005), estabelecendo valores de CIM menores que 10 µg/mL como atividade antimicrobiana excelente;

valores entre 10 e 100 µg/mL, boa atividade, e valores entre 100 e 500 µg/mL, atividade moderada. Valores acima de 500 µg/mL são considerados de atividade fraca ou nula. Os resultados estão expressos na Tabela 17.

TABELA 17 - CLASSIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS ALCANÇADAS PELAS AMOSTRAS, SEGUNDO MACHADO *et al* (2005)

AMOSTRA	CLASSIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA				
	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>
F. aquosa	■	■	■	■	■
F. etanol	■	■	■	■	■
F. acetato de etila	■	■	■	■	■
F. diclorometano	■	■	■	■	■
F. hexano	■	■	■	■	■
Óleo essencial	■	■	■	■	■
Composto BAD1	■	■	■	■	■

■ : Fraca ou nula ■ : Moderada ■ : Boa, F.: Fração

Na literatura, é conhecida a capacidade antibacteriana e antifúngica de polifenóis, como flavonoides e taninos, bem como a de esteroides e triterpenos (EVANS, 1996; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2007; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Os mesmos bioativos detectados nas frações na análise fitoquímica das folhas secas de *Eucalyptus badjensis* apresentaram atividades moderada frente a *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (exceto a fração etanólica) e *C. albicans* e boa frente a *S. epidermidis* (exceto o óleo essencial e o composto BAD1).

Segundo Dalmarco (2009), os compostos polifenólicos possuem a capacidade de complexar a parede celular das bactérias, impedindo o seu crescimento e multiplicação. Flavonoides, como a canferitrina, conseguem até mesmo inibir o crescimento e multiplicação de microrganismos por induzirem dano ao DNA bacteriano. O autor também relata sobre a atividade antibacteriana atribuída à triterpenos, como o ácido oleanólico, que pode levar à ruptura da membrana celular bacteriana. Ao incorporar triterpenos à sua composição, a membrana celular perde a sua fluidez, diminuindo a mobilidade bacteriana ou mesmo levando à sua ruptura.

Estudando a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de folhas de *Syzygium cumini*, (Myrtaceae), por difusão em disco, Oliveira *et al.* (2007) observaram CIM = 90 µg/mL frente a *C. albicans*; CIM = 200 µg/mL frente a *E. coli* e CIM = 90 µg/mL para *P. aeruginosa*. O autor atribuiu as atividades obtidas à presen-

ça de taninos e outros compostos fenólicos, como glicosídeos flavônicos, miricetina e canferol.

Ao avaliarem a atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações obtidas de *Plinia glomerata*, por macrodiluição, Serafin *et al.* (2007) evidenciaram CIM > 1000 µg/mL para o extrato bruto, fração hexano, fração diclorometano e fração acetato de etila, e CIM = 500 a 1000 µg/mL para a fração aquosa, frente a bactéria *E. coli*. A atividade antifúngica contra a levedura *C. albicans* revelou CIM > 250 µg/mL para o extrato acetônico, metanólico e fração aquosa.

Em seu estudo, Boscardin (2009) avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial de folha secas de *E. benthamii* e constatou que o óleo bruto possui atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

O estudo da atividade antifúngica do óleo essencial de folhas secas de *E. globulus* ssp. *bicostata*, desenvolvido por Malinowski (2010), por difusão em disco, evidenciou a atividade fungicida do óleo bruto frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *Malassezia pachydermatis*. A atividade foi atribuída a ação sinérgica dos terpenoides presentes.

6 CONCLUSÕES

As folhas secas de *Eucalyptus badjensis* revelaram um bom rendimento de óleo essencial, com alto teor de 1,8-cineol (81,17%), um dos mais procurados metabólitos em óleos essenciais de *Eucalyptus*.

A análise do composto BAD1 por cromatografia acoplada ao espectrômetro de massas revelou que o composto se refere a mistura de possíveis três sesquiterpenos, com tempos de retenção muito próximos, que necessita de melhores estudos.

A análise fitoquímica dos extratos de *Eucalyptus badjensis* evidenciou a presença de flavonoides, leucoantocianidinas, esteróides e/ou triterpenos, glicosídeos saponínicos, ácidos fixos, taninos e aminogrupos nas folhas secas, caules e cascas do tronco. As folhas secas exibiram expressiva concentração de compostos fenólicos.

Na microscopia óptica e eletrônica de varredura, foi evidenciado que as folhas possuem epiderme uniestratificada, estômatos anomocíticos em ambas as faces, mesofilo isobilateral, cavidades secretoras abaixo da epiderme, cristais de oxalato de cálcio, sistema vascular bicolateral em arco aberto e nervura central com contorno plano-convexo, súber cicatricial e cutícula lisa. Características que coincidem com os relatos da literatura para o gênero.

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio o composto BAD1 apresentou atividade superior ao da rutina e bem próxima do ácido ascórbico. Pelo método do DPPH, as frações aquosas alcançaram os melhores resultados, evidenciando a ação dos polifenóis.

Quanto à atividade antimicrobiana, as frações testadas exibiram resultados promissores. O óleo essencial de folhas secas e o composto BAD1 não alcançaram atividade relevante nas concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABE, S. Y.; INOUE, P. S.; TAKAHASHI, T. T.; RODRIGUES, M. A. A. D.; MENDES, S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante e teor de flavonoides das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. – Myrtaceae. **XVII Jornada de Jovens Investigadores- AUGM**. Entre Rios- Ar. 2009 (on-line).
- ABNT. **NBR 5784**: Óleos essenciais, determinação da massa específica e densidade relativa, método de ensaio. Rio de Janeiro, 1985a. 3p.
- ABNT. **NBR 5785**: Óleos essenciais, determinação do índice de refração, método de ensaio. Rio de Janeiro, 1985b. 2p.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, Illinois: Allured Publishing, 2007.
- ALMEIDA, I. F.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; COSTA, P. C.; BAHIA, M. F. Oxygen and nitrogen reactive species are effectively scavenged by *Eucalyptus globulus* leaf water extract. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 1, p. 175-179, 2009.
- AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S. H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TONOGAI, Y. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. **Food Chemistry**, v. 77 p. 47–56, 2002.
- ARAUJO, P. W. B., *et al.* Flavonóides e Hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.12, n.3, p.188-189, jul-set 2005.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009
- BARTHOLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.126, p.237-260, 1998.
- BENYAHIA, S.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; LEÓN, F.; QUINTANA, J.; LÓPEZ, M.; HERNÁNDEZ, J.; ESTÉVEZ, F.; BERMEJO, J. Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 627-632, 2005.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**, Iowa: Iowa University, 1976.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1959, 1958.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage-Myrtaceae**. Curitiba, 2009. 139f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BOSCARDIN, P. M. D.; FARGO, P. V.; NAKASHIMA, T.; SANTOS, P. E. T.; PAULA, J.F.P. Estudo Anatômico e Prospecção Fitoquímica de Folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Latin American Journal of Pharmacy**. Buenos Aires, v. 29, n. 1, p. 94-101, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRITO, J. F. A.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol metacrilate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 9th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.

CARPANEZZI, A. A. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado de Santa Catarina**. Curitiba: EMBRAPA: CNPF, 1988. 113 p.

CHAGAS, A. C. S.; *et al.* Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, n.5, p.247-253, 2002.

CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement M100-S15, Wayne, PA, 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 11, n.1, p. 47 - 52, ago./dez. 2004.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Food Chemistry**, v. 90, p. 503-511, 2005.

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R.. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 701p.

DALMARCO, J. B. **Lotus corniculatus L. cv. São Gabriel: Análise Fitoquímica e Atividade Biológica**. Florianópolis, 2009, 91f. Dissertação (mestrado) – Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

DOMINGUES, R. M. A.; SOUZA, G. D. A.; SILVA, C. M.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. High value triterpenic compounds from the outer barks of several *Eucalyptus* species cultivated in Brazil and in Portugal. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 158-164, 2011.

DORNAS, W. C.; *et al.* Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.28, n.3, p.241-249, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ELDRIDGE, K. G.; *et al.* **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford : Oxford University Press, 1994.

ENSIKAT, H. J.; BOESE, M.; MADER, W.; BARTHLOTT, W.; KOCH, K. Crystallinity of plant epicuticular waxes: electron and X-ray diffraction studies. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 144, p. 45-59, 2006.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PEÑA, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p.95-100, 2001.

EVANS, W. C. **Trease and Evans pharmacognosy**. 14. ed. London: W. B. Saunders, 1996. 612 p.

EVANS, W. C.; TREASE, G. E. **Trease y Evans: Farmacognosia**. 13. ed. Mexico: Nueva Editorial Interamericana, 1991. 901 p.

FABROWSKI, F. J. **Eucalyptus smithii R. T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002. 225f. Tese (doutorado) - Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 163-179.

FAO. **Eucalypts for planting**. Rome: FAO, 1979. 677p.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988-2005.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v. Muell. ex.Benth., Myrtaceae**. Curitiba, 2005. 70f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, p.731-737, 2010.

GLOWNIAK, K.; SKALICKA, K.; LUDWICZUK, A.; JOP, K. Phenolic compounds in the flowers of *Lavatera trimestris* L. (Malvaceae). **Journal of Planar Chromatography**, v.18, p.264-268, 2005.

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

GOODGER, J. Q. D.; HESKES, A. M.; MITCHELL, M. C.; KING, D. J.; NEILSON, E. H.; WOODROW, I. E. Isolation of intact sub-dermal secretory cavities from *Eucalyptus*. **Plant Methods**, v.6, n. 20, p.1-10, 2010.

GUENTHER, E. **The essential oils** (Individual essential oils of the plant families Gramineae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae). 3 ed. New York: Van Nostrand, 1961. v. 4.

GUIMARÃES, R.; SOUSA, M. J.; FERREIRA, I. F. F. R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p.152-156, 2010.

GUTIÉRREZ, R. M. P. **Compuestos aislados de plantas con actividad antiinflamatoria, antiviral e hipoglucemiante**. México: Instituto Politécnico Nacional, 2002. 192p.

HASSAN, S. B.; GALI-MUHTASIB, H.; GÖRANSSON, H.; LARSSON, R. Alpha Terpineol: A potential anticancer agent which acts through suppressing NF-κB signalling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p.1911-1919, 2010.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; ALVES, E. C. ***Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch espécie potencial para produção de madeira e óleos essenciais no sul do Brasil**. Colombo: Embrapa, 2002. 2 p.

JAMES, S. A.; SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C. Ontogenetic differences in mesophyll structure and chlorophyll distribution in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* - (Myrtaceae). **American Journal of Botany**, v. 86, n. 2, p.198-207, 1999.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 599-606, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOHNSON, E. D. A comparison of the juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 25, p. 202-212, 1926.

JOHNSON, T. L.; FORBES, B. A.; O'CONNOR-SCARLET, M.; MACHINSKI, A.; McCLATCHEY, K. D. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 83, n. 3, p. 374-378, 1985.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7.ed. São Paulo: Nacional, 1985. p. 504-505.

LIMA, W. de P. **Impacto ambiental do eucalipto**. 2.ed. São Paulo: EDUSP, 1996.

LOPES, M. M. **Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (Kiaersk) G. M. Barroso & Sobral (Myrtaceae)**. Viçosa, 2008, 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512p.

LUQUE, R.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 199-211, 1996.

MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MAERTENS, J. A.; BOOGAERTS, M. A. Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. **Current Pharmaceutical Design**. v. 6, n. 2, p. 255-239, 2000.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat., Myrtaceae**. Curitiba, 2010, 117f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização Morfoanatômica das folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 5, p. 756-61, 2009.

MANGIERI, H. R.; DIMITRI, M. J. **Los eucaliptos en la silvicultura**: estudio botánica y florestal de las especies más comúnmente cultivadas en Sudamérica. Buenos Aires : ACME, 1961.

MANTERO, C.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, P.; ESCUDERO, R.; PRIORE, E.; MENÉNDEZ, P. Potencialidad para producción de aceites esenciales en especies *Eucalyptus* cultivadas en Uruguay. **Agrociencia**, v. 11, n. 2, p. 17-23, 2007.

MEDHI, S. M.; REZA, S.; MAHNAZ, K.; REZA, A. M.; ABBAS, H.; FATEMEH, M.; HASSAN, V. Phytochemistry and larvicidal activity of *Eucalyptus camaldulensis* against malaria vector, *Anopheles stephensi*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 11, p. 841-845, 2010.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, 1950, v. 2.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1 – 19, 1979.

NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique évaluation dès activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N. B. Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** 198f. These INP, Toulouse, France, 1993.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T.. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 553-556, 2009.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B.; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. **Ciência Florestal**, v. 8, n. 1, p. 67-76, 1998.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474 p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 381-384, 2007.

PENFOLD, A. R. **The eucalypts** : botany, cultivation, chemistry and utilization. London : Leonardo Hill, 1961.

PHARMACOPEA Helvetica. 7. ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1993. Suppl. 1990. v. 4-6.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PROS, J. S. **Cúrate con las plantas medicinales** : prontuário de medicina vegetal. Barcelona: Sintesis, 1976.

RAHMAN, M.; KUHN, I.; RAHMAN, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; MOLBY, R. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2398-2403, 2004.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v.100, p.657-691, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

ROBINSON, T. **The organic constituents of higher plants**: their chemistry and interrelationships. 6th ed. North Amherst: Cordus Press, 1991

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 23-34, jul-dez 2007.

ROESER, K. R. Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SALGADO, A. P. S. P., *et al.* Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 249-254, mar-abr 2003.

SANTOS, G. G.; ALVES, J. C. N.; RODILLA, J. M. L.; DUARTE, A. P.; LITHGOW, A. M.; URONES, J. G. Terpenoids and other constituents of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1309-1312, 1997.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007. p. 403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 615-656.

SANTOS, S. C.; WATERMAN, P. G. Polyphenols from *Eucalyptus consideriana* and *Eucalyptus viminalis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 95-97, 2001.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p.711-740.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional**: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. Barueri, SP: Manole, 2002.

SEGREDOS e virtudes da plantas medicinais. Lisboa: Selecções do Reader's Digest, 1993.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, A. B.; MONACHE, F. D.; GETE, M. A.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 578-582, 2007.

SHIVA, V.; PADHYAY, J.B. **Inventário ecológico sobre o cultivo do eucalipto**. Belo Horizonte: CPT/MG, 1991.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. **Revista Medicina**. Ribeirão Preto, v.35, n. 2 p. 127-133, abr-jun 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 387-415.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**: a handbook for laboratories of pure and applied botany. Oxford: Clarendon Press, 1908, v. 2.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography – A laboratory handbook**. New York: Springer, 1969.

- STEINBAUER, M. J.; SCHIESTL, F. P.; DAVIES, N. W. Monoterpenes and epicuticular waxes help female autumn gum moth differentiate between waxy and glossy *Eucalyptus* and leaves of different ages. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 6, p. 1117-1142, 2004.
- SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2007.
- TANTAWY, M. E. Morpho-anatomical study on certain taxa of Myrtaceae. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 3, p. 274-283, 2004.
- TARAN, M.; GHASEMPOUR, H. R.; SHIRINPOUR, E.. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. *carduchorum*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 10-14, 2010.
- THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12 ed. Rahway: Merck, 1996.
- TOLEDO, M. G. T.; NAKASHIMA, T. **Contribuição ao estudo da *Aniba rosaeodora* Ducke**. Curitiba, 1996. 46f. Monografia (Especialização) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- TRUEBA, G. P. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**. v. 22, n. 1, p. 48-57, 2003.
- TUFFI-SANTOS, L. D.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; MEIRA, R. M. S. A.; TIBURCIO, R. A. S.; FERREIRA, F. A.; MELO, C. A. D.; SILVA, E. F. S. Visuais e anatómicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalypts grandis*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 9-16, 2008a.
- TUFFI-SANTOS, L. D.; THADEO, M.; IAREMA, L.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 32, p. 769-779, 2008b.
- TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**. 9. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988. 519 p.
- VÁZQUEZ, G.; FONTENLA, E.; SANTOS, J.; FREIRE, M. S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 279-285, 2008.
- VELJIĆ, M.; CIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; JANAČKOVIĆ, P.; MARIN, P. D. Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. **Archives of Biological Sciences, Belgrade**, v. 62, n. 2, p. 381-395, 2010.

VIEIRA, A. P.; SANTOS, N. R.; BORGES, J. H. S.; VINCENZI, M. P. A.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 65-74, jan-jun 2008.

VITAL, B. R., *et al.* Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de Eucalipto para produção de chapas de flocos. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 4, p. 571-582, 2004.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Universidade de São Paulo: Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Óleo essencial de Eucalipto**. São Paulo, 2003. 26f. (Documentos,17).

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Dragenanalyse: Dunnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen**. Berlin: Springer, 1983.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

WANG, C. K.; LEE, W. H.; PENG, C. H. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1185-1188, 1997.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 1-112, 1963.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, p. 379-391, 2001.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente**. Chapecó: Argos, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007, p. 577-614.