

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA ROCHA LOURES MALINOWSKI

**MORFOANATOMIA, FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOLHAS
JOVENS DE *Eucalyptus globulus* LABILL. SUBESPÉCIE *bicostata* (MAIDEN *et al.*)
J. B. KIRKPAT., MYRTACEAE**

**CURITIBA
2010**

LETÍCIA ROCHA LOURES MALINOWSKI

**MORFOANATOMIA, FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FOLHAS
JOVENS DE *Eucalyptus globulus* LABILL. SUBESPÉCIE *bicostata* (MAIDEN *et al.*)
J. B. KIRKPAT., MYRTACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tomoe Nakashima

**CURITIBA
2010**

Malinowski, Letícia Rocha Loures

Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* subespécie *bicostata* (Maiden *et al.*) J. B. Kirkpat., Myrtaceae / Letícia Rocha Loures Malinowski – Curitiba, 2010.

117 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Dra. Professora Tomoe Nakashima
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata*. 2. Morfoanatomia, fitoquímica. 3. 1,8 – Cineol. 4. Atividades biológicas. 5. Antioxidante. 6. Antifúngico. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1

Dedico este trabalho à minha mãe,
Telma Bittencourt da Rocha Loures,
pelo incentivo e apoio
durante o Mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois a fé Nele fez com que as minhas forças aumentassem desde o princípio desta jornada.

À família, pelo suporte em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Tomoe Nakashima, pelo grande enriquecimento dos meus saberes, pela orientação, pela paciência e pela amizade.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de desenvolvimento do meu mestrado.

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

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos.

À Embrapa Florestas, em especial ao Paulo Ernani, ao José Benedito Moreira Antunes, ao Antonio Sadao Kodama e ao Paulo Eduardo Telles dos Santos, pela atenção, disponibilidade e auxílio na coleta do material.

Ao Prof. Dr. Yedo Alquini, pela contribuição fundamental através de seus preciosos conhecimentos de botânica e pelas palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. José Francisco Ghignatti Warth, do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia (LABMOR) da UFPR, pela orientação e dedicação em toda a etapa de atividade antifúngica.

Ao Prof. MSc. João Carlos Possamai, por toda a atenção dispensada nas análises estatísticas desta pesquisa.

À bióloga Rosângela Lameira Pinheiro, do Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas, pelo fornecimento das cepas de leveduras.

À Prof.^a Dr.^a Márcia do Rocio Duarte pela colaboração na confecção das lâminas semipermanentes.

À Maria da Graça Teixeira de Toledo, farmacêutica da Central Analítica da UFPR, por toda a atenção disponibilizada e pela simpatia.

Ao Nilson Belém Filho, do Laboratório de Microtécnica do Departamento de Botânica da UFPR, pela confecção das lâminas permanentes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, pela montagem do material foliar para a microscopia eletrônica de varredura.

Ao Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC), em especial, ao Sérgio Henke, pela colaboração e acompanhamento no uso do microscópio eletrônico de varredura, e à Pércia Aparecida Patriarca pela realização da cromatografia gasosa.

À bióloga e amiga Marina Azevedo, da PUCPR, pela colaboração e empréstimo de equipamento.

Ao Jair José de Lima, do Departamento de Nutrição da UFPR, pela realização da liofilização do extrato.

Aos estagiários Simone Yae Abe, Isis Rosa César e Fábio S. Branco, do Laboratório de Fitoquímica da UFPR, pelo companheirismo e pelo auxílio nos experimentos.

Aos estagiários e técnicas, do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia (LABMOR) da UFPR, por todo o apoio durante o teste antifúngico.

Aos colegas mestrados, pelo companheirismo na fase de nivelamento, em especial, aos amigos do peito conquistados durante esses dois anos: Andressa, Bruno, Isabela, Izabella, Simone e Stella, por todos os nossos bons momentos.

À amiga e companheira de mestrado Patrícia, pelo apoio constante, pelas discussões de metodologia, pelas repetições de experimentos e pelas conversas.

Aos amigos da Biologia, que sempre serão lembrados pela amizade e pela constante parceria em todas as novas etapas da minha vida.

À Hilda Aparecida dos Santos, técnica do Laboratório de Fitoquímica, pelo auxílio no laboratório.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização desta dissertação.

Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e viver com ousadia,
Pois o triunfo pertence a quem se atreve,
E a vida é muito bela para ser insignificante.

Charles Chaplin

O futuro não nos traz nem nos dá nada.
Nós é que, para construí-lo, devemos dar-lhe tudo.

Simone Weil

RESUMO

As essências de *Eucalyptus* spp. consideradas farmacologicamente ativas apresentam como composto majoritário o 1,8-cineol. O *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *bicostata* (Maiden *et al.*) J. B. Kirkpat. ainda é pouco cultivado no Brasil e os estudos relacionados a ele indicam o seu potencial como produtor de óleo essencial. Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi investigar a morfoanatomia, a fitoquímica e as atividades biológicas de folhas jovens dessa subespécie de *E. globulus*. Para isso, foram coletadas amostras sazonais, sendo que as extrações dos óleos essenciais foram realizadas com as folhas secas e frescas de todas as coletas. As essências foram submetidas a análises físico-químicas e a CG/EM. Adicionalmente, foram obtidos os extratos para o estudo fitoquímico. A morfoanatomia revelou as características usuais do gênero *Eucalyptus*. O extrato metanólico, em função da presença de compostos fenólicos, apresentou uma elevada atividade antioxidante na redução do radical DPPH, diferentemente do resultado obtido para o óleo essencial. No método do fosfomolibdênio, o extrato etanólico e o óleo essencial não apresentaram uma capacidade antioxidante considerável, quando comparado ao padrão de ácido ascórbico. O óleo essencial das folhas secas e frescas forneceu um rendimento elevado, sendo que o principal composto de todas as amostras, o 1,8-cineol, apresentou concentração acima de 50%. Na atividade antifúngica, por meio do procedimento de difusão em ágar utilizando discos, o óleo inibiu as 13 cepas testadas, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Considerando as variáveis: folhas frescas/ secas e sazonalidade, testadas para o óleo essencial, os resultados encontrados revelaram que o material botânico pode ser coletado em qualquer período do ano, a partir dos dados de rendimento e de composição química da essência. As folhas jovens do *E. globulus* ssp. *bicostata* demonstraram atividade biológica relevante. A continuidade do estudo é recomendada, para o aproveitamento desse produto natural pela indústria farmacêutica.

Palavras-chave: óleo essencial, 1,8-cineol, eucaliptol, antioxidante, antifúngico.

ABSTRACT

In *Eucalyptus* species considered active pharmacologically the main compound of the essential oil is 1,8-cineole. *Eucalyptus globulus* Labill. subspecies *bicostata* (Maiden et al.) J. B. Kirkpat. is not intensively cultivated in Brazil, and the few studies with it show its potential as essential oil producer. In this context, the objective of this research was to investigate the morpho-anatomy, the phytochemistry and the biological activities of the *E. globulus* subspecies *bicostata* young leaves. For this, seasonal leaves samples were collected, and the essential oil extractions were realized with dried and fresh leaves of all collections. The essences were submitted to physical-chemical and GC-MS analysis. Additionally, the extracts were also obtained for phytochemical studies. The morpho-anatomy showed the common characteristics of *Eucalyptus* genus. The methanolic extract, due to phenolic compounds content, exhibited high antioxidant capacity in the reduction of DPPH radical, differently of the result for the essential oil. In phosphomolibdenum method, neither the ethanolic extract nor the essential oil showed considerable antioxidant activity, when compared to standard of ascorbic acid. The essential oil of dried and fresh leaves provided a high yield, and the major compound in all the samples, the 1,8-cineole, showed concentration over 50%. In the antifungal test, applying the agar diffusion technique with discs, there was inhibition by the oil of the 13 strains tested, belonging to *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* genus. According with the variables dried and fresh leaves and seasonality, tested for the essential oil, the results found demonstrated that the leaves can be collected in any period of the year, from the data of the yield and the chemical composition of the essence. *E. globulus* subsp. *bicostata* young leaves showed important biological activity. Further studies are recommended for the use of this natural product by the pharmaceutical industry.

Key words: essential oil, 1,8-cineole, eucalyptol, antioxidant, antifungal.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO GÁLICO.....	65
GRÁFICO 2 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO E À RUTINA PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNICO.....	79
GRÁFICO 3 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DO DPPH.....	83
GRÁFICO 4 - CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO PELO MÉTODO DO DPPH.....	84
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO E DO PADRÃO NISTATINA POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO E O CRESCIMENTO FÚNGICO EM MM.....	92

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - TAXONOMIA DE <i>Eucalyptus globulus</i> LABILL. ssp. <i>bicostata</i> (MAIDEN <i>et al.</i>) J. B. KIRKPAT.....	37
QUADRO 2 - CONTROLE DAS COLETAS E DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS.....	42
QUADRO 3 - PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20% E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	62
QUADRO 4 - PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO AQUOSO A 20% E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DE UM COMPOSTO FENÓLICO	21
FIGURA 2 - NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES.....	23
FIGURA 3 - TANINO HIDROLISÁVEL ÁCIDO GÁLICO E MONÔMERO BÁSICO DE TANINO CONDENSADO	25
FIGURA 4 - RAMO DE FOLHAS JOVENS E DETALHE DO CAULE DE <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	39
FIGURA 5 - GEMAS E FRUTOS DO <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	39
FIGURA 6 - MOLÉCULA DE DPPH, ANTES E DEPOIS DE RECEBER UM ELÉTRON	51
FIGURA 7 - SECÇÃO PARADÉRMICA DA FOLHA	56
FIGURA 8 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA LÂMINA FOLIAR	57
FIGURA 9 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA LÂMINA FOLIAR	58
FIGURA 10 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL DA FOLHA	59
FIGURA 11 - FACÊS DA FOLHA POR MEV	60
FIGURA 12 - CROMATOPLACA, EVIDENCIANDO A REVELAÇÃO DO 1,8-CINEOL NA AMOSTRA E NO PADRÃO.....	73
FIGURA 13 - AMOSTRAS DO ÓLEO ESSENCIAL EM CONCENTRAÇÕES DE 0,6 A 6 mg/ml NO TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM O DPPH.....	82
FIGURA 14 - AMOSTRAS DO EXTRATO METANÓLICO EM CONCENTRAÇÕES DE 1 A 5 µg/ml NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM O DPPH.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	66
TABELA 2 - DENSIDADE RELATIVA E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	70
TABELA 3 - SOLUBILIDADE EM ETANOL DO ÓLEO ESSENCIAL.....	71
TABELA 4 - CG/EM DAS AMOSTRAS DO ÓLEO DE FOLHAS FRESCAS DE <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	74
TABELA 5 - CG/EM DAS AMOSTRAS DO ÓLEO DE FOLHAS SECAS DE <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	75
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES E DAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DO DPPH	84
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO, DA DILUIÇÃO 75% E DO PADRÃO NISTATINA POR MEIO DA MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO	89
TABELA 8 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO E DO PADRÃO NISTATINA POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO E O CRESCIMENTO FÚNGICO	91
TABELA 9 - ATIVIDADE FUNGISTÁTICA/FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO	93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
α	Alfa
α_D	Rotação óptica
ANOVA	Análise de variância
APD	Agar Potato Dextrose
β	Beta
BM	Banho-maria
C	Carbono
Ca	Cálcio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CECON	Centro de controle e produtos para diagnósticos
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a detector de massa
cm	Centímetro
d	Densidade
dm	Decímetro
DMS	Diferença mínima significativa
DPPH	2,2- difenil- 1- picrilhidrazila
<i>E.</i>	<i>Eucalyptus</i>
EC ₅₀	Concentração para reduzir em 50% o DPPH
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>et al.</i>	Expressão latina abreviada <i>et alli</i> (= e outros)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fe	Ferro
g	Gramma
H	Hidrogênio
ha	Hectare
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K	Potássio
kg	Kilograma
kPa	Quilopascal
l	Litro
LACTEC	Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento
m	Massa
m	Metro
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
min	Minuto
ml	Mililitro
mg	Miligramma
Mg	Magnésio
mm	Milímetro
mmol	Milimol
Mo	Molibdênio

morfo	Morfologia
m/v	Massa por volume
N	Nitrogênio
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
O	Oxigênio
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Paraná
p/p	Peso por peso
qsp	Quantidade suficiente para
REUNI	Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
Rf	Referência
RS	Rio Grande do Sul
RJ	Rio de Janeiro
seg	Segundo
SM	Solução mãe
sp.	Relativo a espécie do gênero
spp.	Relativo a espécies do gênero
ssp.	Subespécie
ufc	Unidade formadora de colônia
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
v/v	Volume por volume
vol.	Volume
WHO	World Health Organization
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE	18
3.2 GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	18
3.2.1 Introdução do eucalipto no Brasil	19
3.2.2 Distribuição e importância do <i>Eucalyptus</i> spp.	20
3.3 GRUPOS FENÓLICOS	21
3.3.1 Flavonóides	22
3.3.2 Taninos	24
3.4 ÓLEO ESSENCIAL	26
3.4.1 Óleo essencial de eucalipto	27
3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	29
3.5.1 Atividade antimicrobiana	30
3.5.2 Atividade antioxidante	35
3.6 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	37
3.7 <i>Eucalyptus globulus</i> LABILL. ssp. <i>bicostata</i> (MAIDEN et al.) J. B. KIRKPAT	38
3.7.1 <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i> cultivado fora da área nativa	40
3.7.2 <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i> no Brasil	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Material botânico	41
4.2 Caracterização morfoanatômica de <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	42
4.2.1 Montagem das lâminas semipermanentes	42
4.2.2 Montagem das lâminas permanentes	43
4.3 Determinação do teor de umidade	43
4.4 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v)	44
4.5 Preparo do extrato aquoso a 20% (p/v)	45
4.6 Ensaios fitoquímicos do extrato hidroalcoólico a 20%	45
4.7 Ensaios fitoquímicos do extrato aquoso a 20%	46
4.8 Determinação de fenólicos totais	46
4.9 Extração do óleo essencial	47
4.10 Análises físico-químicas do óleo essencial	47
4.10.1 Determinação da densidade relativa	48
4.10.2 Determinação do índice de refração	48
4.10.3 Determinação da solubilidade em etanol	48
4.11 Análises estatísticas do rendimento do óleo essencial	48
4.12 Análises cromatográficas	48
4.13 Atividade antioxidante	49
4.13.1 Método fosfomolibdênico	49
4.13.2 Método do DPPH	51
4.14 Atividade antifúngica	53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Caracterização morfoanatômica do <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	55
5.1.1 Lâminas semipermanentes	55
5.1.2 Lâminas permanentes	56
5.1.3 Análise ultra-estrutural.....	59
5.2 Teor de umidade	61
5.3 Ensaio fitoquímico	61
5.4 Determinação de fenólicos totais	64
5.5 Óleo essencial das folhas de <i>E. globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	66
5.5.1 Rendimento	66
5.5.2 Análises físico-químicas	70
5.5.3 Composição química.....	72
5.6 Atividade antioxidante	79
5.6.1 Método fosfomolibdênico.....	79
5.6.2 Método do DPPH	80
5.7 Atividade antifúngica	87
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICES	114

1 INTRODUÇÃO

As plantas proporcionam ao homem inúmeros benefícios, como vestuário, alimentação, cosméticos, aromas e, tão importante quanto todos esses, os medicamentos, chamados fitoterápicos.

Os primeiros registros do uso medicinal das plantas são da Mesopotâmia, aproximadamente em 2600 a. C. Com o passar do tempo, os fitoterápicos formaram a base para vários sistemas médicos, como o Ayurvédico, o Unani e o Chinês (GURIB-FAKIM, 2006).

No Brasil, quando os europeus chegaram, depararam-se com inúmeras tribos indígenas que utilizavam espécies vegetais com propriedades curativas. Este contato com a flora medicinal brasileira fez com que os colonizadores testassem usos semelhantes para as espécies nativas da Europa. Os escravos africanos também conheciam os poderes das plantas e trouxeram para o Brasil várias espécies, que além de serem farmacologicamente ativas, eram usadas em rituais religiosos. Com esse intercâmbio de informações, formou-se no nosso país a base para a tradição no uso de fitoterápicos (LORENZI; MATOS, 2002).

Há incentivos para a pesquisa na área de plantas medicinais, como o interesse pelos produtos naturais (ÓLEOS, 2003) e o aumento significativo na incidência de microrganismos resistentes a antibióticos (FINCH, 1998).

A consequência desse interesse pode ser observada nos dados referentes aos produtos naturais e seus derivados, pois representam um número significativo perante todos os medicamentos de uso clínico no mundo e, nos últimos 40 anos, no mínimo uma dúzia de fármacos potentes derivaram de angiospermas. Um quarto de todas as prescrições médicas são formulações baseadas em substâncias derivadas de vegetais ou análogos sintéticos de derivados de plantas (GURIB-FAKIM, 2006). Este fato demonstra que as espécies botânicas não devem ser consideradas apenas matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, mas também recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (DI STASI, 1996).

A maioria dos princípios ativos vegetais são substâncias procedentes do metabolismo secundário (GURIB-FAKIM, 2006). Antigamente, esses compostos foram denominados subprodutos, sem importância, do metabolismo primário. Mas, por meio de estudos que avaliaram as rotas biossintéticas elaboradas, foi possível afirmar que os metabólitos secundários são essenciais para a sobrevivência e para a

preservação da planta, além de alguns deles serem farmacologicamente ativos (POSER; MENTZ, 2007).

O caráter medicinal de espécies do gênero *Eucalyptus* está principalmente ligado à presença majoritária de um componente do óleo essencial, o eucaliptol (1,8-cineol). No Brasil, a principal espécie cultivada que apresenta esse composto em altas concentrações é o *Eucalyptus globulus* Labill., (VITTI; BRITO, 2003).

Segundo BOLAND, BROPHY e HOUSE¹ apud VITTI e BRITO (2003), existem quatro subespécies de *E. globulus* produtoras de óleo essencial, e uma delas é o *Eucalyptus globulus* Labill. subespécie *bicostata* (Maiden *et al.*) J. B. Kirkpat. Deste eucalipto utiliza-se a madeira e o teor de 1,8-cineol pode chegar a 80% do total de óleo.

Devido à escassa literatura sobre o *E. globulus* ssp. *bicostata* no Brasil, existe a necessidade de se aprofundar os conhecimentos fitoquímicos e das possíveis atividades biológicas dessa subespécie, visando o uso como um fitoterápico.

Esse estudo pode ser considerado promissor, porque uma grande área do território brasileiro é ocupada por reflorestamentos com eucaliptos. Além disso, há a perspectiva de que ocorra ainda mais o crescimento dessa cultura. Por esse motivo, os óleos essenciais passam a ter um interesse econômico crescente, uma vez que as folhas do eucalipto correspondem a um bioproduto do corte das árvores e o seu uso como recurso para a biomassa é considerado um tema importante para a pesquisa (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

Da mesma maneira, com os resultados obtidos, essa subespécie pode ser apontada para possíveis estudos de hibridização com outras espécies de eucalipto, buscando otimizar a qualidade do óleo e o aperfeiçoamento da madeira.

¹ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a morfoanatomia, a fitoquímica e as atividades biológicas de folhas de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J. B. Kirkpat. (Myrtaceae).

2.2 Objetivos específicos

Realizar quatro coletas sazonais (primavera, verão, outono e inverno) de folhas de *E. globulus* ssp. *bicostata* na Embrapa Florestas (Colombo-PR);
Caracterizar morfoanatomicamente os elementos estruturais constituintes das folhas;
Preparar o extrato aquoso e o extrato hidroalcoólico a partir das folhas secas;
Determinar os grupos de metabólitos vegetais presentes nos extratos;
Extrair o óleo essencial de folhas frescas e secas provenientes de cada coleta;
Identificar a composição química do óleo essencial;
Determinar as características físico-químicas do óleo essencial;
Verificar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial e de extratos das folhas;
Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial;
Analisar e comparar os resultados dos testes realizados com o óleo essencial, visando identificar a variação do rendimento e da composição química frente à época da colheita;
Comparar os resultados da pesquisa do *E. globulus* ssp. *bicostata* com os dados da literatura referentes ao *E. globulus*, oficializado na Farmacopéia Brasileira.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae Juss. apresenta cerca de 100 gêneros com aproximadamente três mil espécies distribuindo-se em todo o mundo, mas com dois grandes centros de dispersão: as Américas e a Austrália (JOLY, 1998).

As espécies são cultivadas com finalidade ornamental, pelos frutos comestíveis, para madeira e lenha ou como fonte de essências de valor comercial (SIANI *et al.*, 2000).

As Myrtaceae quase sempre apresentam proantocianinas e, usualmente, possuem ácidos gálico e elágico. Às vezes, produzem saponinas e raramente compostos cianogênicos (CRONQUIST, 1981). Os óleos voláteis encontrados podem ser formados por monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, outros terpenóides e polifenóis. Esses metabólitos estão presentes em abundância, dispersos e em cavidades secretoras, que ocorrem na maioria ou em todos tecidos sem lignina. Também estão presentes células contendo compostos fenólicos, de modo disperso, e cristais de oxalato de cálcio encontrados na forma solitária ou agrupados nas células dos tecidos parenquimatosos (CRONQUIST, 1981).

No Brasil, os representantes da família caracteristicamente apresentam o tronco de casca lisa, separando-se todo o ano o ritidoma, que se renova com cada estação de crescimento (JOLY, 1998). No país são frequentes muitos representantes, como a goiaba (*Psidium guajava* L.), o araçá (*Psidium cattleianum* S.), a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg), a pitanga (*Eugenia uniflora* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha* C.), a grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam.), a cereja-nacional (*Eugenia cerasiflora* Miq.) e o eucalipto (*Eucalyptus* L'Hér.) (JOLY, 1998).

Um dos maiores gêneros da família Myrtaceae é o *Eucalyptus* (CRONQUIST, 1981).

3.2 GÊNERO *Eucalyptus*

O *Eucalyptus* L'Hér. é originário da Austrália e corresponde ao gênero mais importante das florestas desse país, constituindo cerca de $\frac{3}{4}$ da vegetação

continental (BRAGA, 1971² apud FABROWSKI, 2002). É representado por mais de 700 espécies distribuídas em todo o mundo (BATISH *et al.*, 2008). O eucalipto é usado desde os aborígenes australianos, que, além de utilizar a madeira, desfrutavam das folhas, das raízes e de outras partes do vegetal para a cicatrização de feridas e em infecções microbianas (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

O gênero foi denominado por L' Hérítier de Brutelle em 1788, quando publicou *Eucalyptus obliqua* L'Hér., que se distribuía amplamente em regiões alagadas do leste-sul do continente australiano, Tasmânia e Ilha Canguru. Essa espécie foi determinada a partir de um espécime coletado por um botânico no sul da Ilha Bruny, na Tasmânia, na terceira expedição marítima do capitão James Cook em 1777 (BROOKER *et al.*, 2002). O nome *Eucalyptus* deriva do grego *eu* (=bem) e *kalypto* (=eu cubro), em alusão ao opérculo que reveste as sementes totalmente desenvolvidas (PENFOLD; WILLIS, 1961).

É uma das árvores mais altas do mundo e apresenta raízes profundas, quase sempre ectomicorrizas (associações mutualísticas entre fungos e raízes), que buscam água em lençóis d'água subterrâneos (LAVABRE, 2001; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Os *Eucalyptus* spp., em geral, apresentam fruto seco, capsular e folhas alternas, sendo que no Brasil a floração é no início da primavera (JOLY, 1998). As folhas possuem cheiro forte (aromático), balsâmico e próprio; o sabor é amargo, resinoso, primeiramente quente e depois com sensação de frescor (COSTA, 1975).

Outra característica dos eucaliptos é a presença de um lignotubérculo, que corresponde a pequenas protuberâncias nas axilas dos cotilédones da plântula ou nos primeiros pares de folhas. É um órgão protetor subterrâneo que permite que a planta emita novos brotos, caso alguma parte aérea tenha sido destruída. As protuberâncias se fundem ao redor do caule, muito próximo da raiz, e podem ficar parcialmente ou totalmente enterradas (FAO, 1981).

3.2.1 Introdução do eucalipto no Brasil

No Brasil, não se sabe ao certo definir quando houve a introdução do eucalipto. Há registros de que as primeiras árvores, das espécies *Eucalyptus*

² BRAGA, H. C. **Os óleos essenciais do Brasil, estudo econômico**. Rio de Janeiro: Instituto de Óleos, 1971.

globulus Labill., *Eucalyptus amygdalina* Labill. e *Eucalyptus polyanthemos* Schauer, foram plantadas no Rio Grande do Sul em 1868 por Frederico de Albuquerque. Nesse mesmo ano, o Primeiro Tenente da Marinha, Pereira da Cunha, teria plantado alguns exemplares na Quinta do Boa Vista, no Rio de Janeiro (SAMPAIO, 1975).

Em 1909, em um artigo publicado no Correio da Manhã, Osório Duque Estrada afirmou que na chácara de seu progenitor, na Gávea (RJ), havia vários exemplares de *E. globulus*, que pelo porte deviam ter sido plantados em 1855. J. Barbosa Rodrigues, em 1894, publicou no seu *Hortus Fluminensis* que frei Leandro do Sacramento, diretor do Jardim Botânico (RJ), havia plantado dois exemplares de *Eucalyptus gigantea* Desf., durante sua regência nos anos de 1824 a 1829. Essas árvores constam no catálogo de plantas cultivadas do Jardim Botânico (SAMPAIO, 1975).

O início da cultura econômica dos eucaliptos ocorreu pela Companhia Paulista de Estradas de Ferro, mediante o trabalho do silvicultor Edmundo Navarro de Andrade. Ele, por meio de pesquisas entre 1904 e 1909, no Horto de Jundiaí, percebeu que os eucaliptos se destacavam frente a outras espécies e, então, começou o plantio em larga escala. Navarro importou sementes de 144 diferentes espécies da árvore e selecionava as regiões ecologicamente parecidas com as da Austrália para o seu plantio (SAMPAIO, 1975).

3.2.2 Distribuição e importância do *Eucalyptus* spp.

A distribuição do eucalipto é ampla, ocorrendo em várias partes do mundo, em função de ser uma árvore de fácil cultivo, crescimento rápido e boa adaptabilidade. Estas características foram obtidas ao longo de sua evolução, que também permitiu ao eucalipto suportar condições de estresse hídrico, de temperatura e de carência nutricional (FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Hoje, esse cultivo é de grande importância para muitos países, como a África do Sul, a China, a Índia e o Brasil (BROOKER *et al.*, 2002).

Dados recentes apontam que o setor florestal brasileiro possui 477,7 milhões de hectares (ha) de florestas nativas, sendo 5,74 milhões ha de florestas plantadas e, desse total, 3,55 milhões ha são plantações com eucaliptos (SBS, 2007).

Segundo SILVA³ apud FABROWSKI (2002), os eucaliptos mais utilizados no Brasil são: *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden (55%), *Eucalyptus saligna* Sm. (17%) e *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake (9%).

O gênero *Eucalyptus*, além de se destacar economicamente pela madeira de reflorestamento, apresenta espécies com várias propriedades, como: antifúngica, antisséptica, adstringente, antiinflamatória, antibactericida, repelente, cicatrizante e desinfetante (ESTANISLAU *et al.*, 2001). Também é usado como expectorante pulmonar e como descongestionante nasal e da garganta, sob a forma de inalações (COSTA, 1975).

As folhas de eucalipto já foram aprovadas como aditivos para alimentos, e os extratos também têm sido utilizados em formulações cosméticas (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004). O óleo essencial de eucalipto foi considerado seguro e não-tóxico pela *Food and Drug Authority* nos Estados Unidos. Na Europa, também foi aprovado o uso de essências de eucalipto como aromatizantes em alimentos (BATISH *et al.*, 2008). No Japão, o extrato de folhas de eucalipto está na Lista de Aditivos Alimentares Existentes, como antioxidante (AMAKURA *et al.*, 2002).

3.3 GRUPOS FENÓLICOS

Grande parte dos grupos fenólicos são metabólitos secundários, os quais doze mil foram isolados, sendo que este é um número estimado, abaixo dos 10% do total (COWAN, 1999).

Os grupos fenólicos são compostos químicos caracterizados por, no mínimo, um anel aromático (C₆) com um ou mais grupos hidroxilas (Figura 1). Muitos ocorrem como derivados formados por reações de condensação ou de adição (HARBORNE; DEY, 1997).

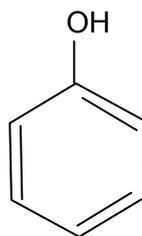


FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DE UM COMPOSTO FENÓLICO

³ SILVA, J. C. Eucalipto: a madeira do futuro. *Revista da Madeira*. Curitiba, setembro, n.59, 114p, 2001.

Esses componentes são encontrados nos vegetais e nos microrganismos, e também participam do metabolismo animal (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Nas plantas, possuem diversas funções, como: defesa contra predadores (microrganismos, insetos e herbívoros) e caracterizadores do odor, da pigmentação e do sabor dos vegetais (COWAN, 1999). Os compostos fenólicos compõem ainda, uma parte das estruturas das paredes celulares, principalmente em componentes poliméricos, como a lignina e a suberina, para o suporte mecânico e como barreira contra invasões microbianas. Além disso, são responsáveis pelo processo de alelopatia, como ocorre no eucalipto, por exemplo, evitando que outros vegetais cresçam ao seu redor (HARBORNE; DEY, 1997). Os fenóis também protegem a planta contra a fotodestruição, absorvendo e/ou dissipando a energia solar e mantendo a integridade dos tecidos mais internos. Certos flavonóides, por exemplo, são acumulados, principalmente, nos tecidos superficiais, e os vegetais os utilizam como filtros UV, pois esses metabólitos absorvem a radiação UV-B sem influenciar na radiação fotossinteticamente ativa (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Pode-se considerar ainda, o fato de que muitos metabólitos secundários estimulam a degradação microbiana de xenobióticos (poluentes) do solo, ampliando ainda mais o espectro de atividades desses compostos (SINGER; CROWLEY; THOMPSON, 2003).

Para os seres humanos, os grupos fenólicos são muito importantes, pois são utilizados na medicina, na alimentação e em vinhos e chás, devido ao sabor adstringente (HARBORNE; DEY, 1997).

Os fenóis compreendem muitos compostos, sendo que esses já foram detectados no gênero *Eucalyptus*.

3.3.1 Flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (ZUANAZZI, 2007).

Mais de cinco mil flavonóides são conhecidos. Aqueles de origem natural apresentam-se, normalmente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (ZUANAZZI, 2007). O esqueleto aglicona de C₁₅ (Figura 2), dividido nos anéis A, B e C, aparece em várias classes estruturais, de acordo com o estado de oxidação e substituição no anel central C de pirano, enquanto os compostos

individuais, dentro da mesma classe, diferem na substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000). Eles podem ser: 1,3-diaril-propanos (flavonóides), 1,2-diaril-propanos (isoflavonóides) e 1,1-diaril-propanos (neoflavonóides) (ZUANAZZI, 2007).

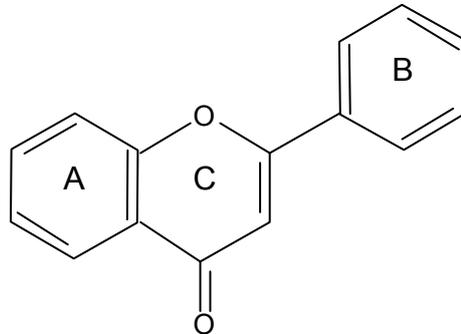


FIGURA 2 – NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES

Esses metabólitos secundários, especialmente as antocianinas, junto com os flavonóis e as flavonas, são os pigmentos responsáveis pela coloração de muitas flores e de alguns frutos, característica fundamental no processo de polinização e de dispersão de sementes. Além disso, os flavonóides protegem a planta contra predadores, controlam a ação de hormônios vegetais, agem no processo de alelopatia e na inibição de enzimas (ZUANAZZI, 2007). São amplamente encontrados em angiospermas, nas quais sua variedade estrutural é máxima. Ocorrem, particularmente, no mesofilo e na epiderme das folhas, e nos frutos estão presentes na cutícula epidérmica (BRUNETON, 1991; HARBORNE; DEY, 1997).

Em relação ao interesse econômico, os pigmentos originados pelos flavonóides são importantes no tingimento de couros, na manufatura do cacau e contribuem na nutrição e no sabor dos alimentos, como frutos e vegetais (ZUANAZZI, 2007). Nas bebidas os flavonóides estão presentes nos vinhos, principalmente tintos, nos chás e, em menor quantidade, nas cervejas, sendo que o vinho e o chá apresentam uma concentração de aproximadamente 200 mg/copo de fenóis totais (PIETTA, 2000). Na indústria farmacêutica, são utilizados pelas ações anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica, antiulcerogênica e antiviral (ZUANAZZI, 2007).

Três flavonóides isolados do *Eucalyptus maculata* Hook. inibiram bactérias Gram-positivas e o fungo *Trichophyton mentagrophytes*, responsáveis por intoxicações alimentares, acne e pé-de-atleta (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

As catequinas formas mais reduzidas dos grupos flavonóicos, são muito estudadas, havendo trabalhos que verificaram sua atividade antimicrobiana contra *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans* e *Shigella* sp. (COWAN, 1999).

Muitos flavonóides e compostos relacionados são, também, conhecidos por possuírem propriedades antioxidantes. Em sua maioria, são agentes removedores dos radicais livres, por meio de propriedades, como a inibição das enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido e pela formação de quelatos com os metais (PIETTA, 2000; MIYAKE; SHIBAMOTO, 1997). Essa atividade dos flavonóides está relacionada à presença de grupamentos hidroxilas, sendo que a maior capacidade é encontrada em polifenóis. A posição do segundo e do terceiro grupamento hidroxila influencia, pois na posição *orto* ou *para*, o poder antioxidante é maior do que em *meta* (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A presença do grupo catecol no anel B também aumenta a capacidade antioxidante, pois este apresenta uma das melhores propriedades em liberação de elétrons (PIETTA, 2000).

O flavonóide quercetina apresenta ação redutora, mesmo em baixas concentrações, pois é um flavonol com cinco hidroxilas fenólicas reativas, sendo que duas delas estão ligadas ao anel B, que é o anel que possui maior atividade redutora. A rutina, também conhecida pelo potencial antioxidante, possui estrutura semelhante à quercetina, mas tem uma substituição glicosídica em uma das hidroxilas, por isso pode apresentar menor atividade (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

3.3.2 Taninos

Os taninos representam uma denominação geral para um grupo de substâncias fenólicas capazes de curtir o couro pelo seu poder de complexação com proteínas, e formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas, uma propriedade conhecida como adstringência (SANTOS; MELLO, 2007). Apresentam peso molecular entre 500 e 3000 Dalton (BRUNETON, 1991). São encontrados em quase todas as partes vegetais: caule, folhas, frutos e raízes. Os taninos podem ser formados por condensações de derivados de flavanos ou por polimerização de unidades de quinona, dividindo-os em hidrolisáveis e condensados (COWAN, 1999).

Os hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (Figura 3). Os condensados, também denominados proantocianidinas, devido aos taninos produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 3). Podem ser divididos em dois tipos, de acordo com a presença ou a ausência de hidroxila na posição C5 do anel A (SANTOS; MELLO, 2007).

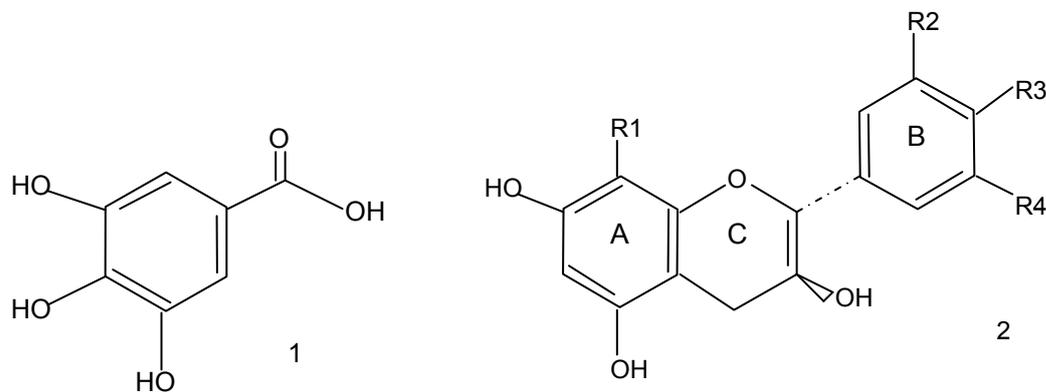


FIGURA 3 – TANINO HIDROLISÁVEL ÁCIDO GÁLICO (1) E MONÔMERO BÁSICO DE TANINO CONDENSADO (2)

Nas plantas, os taninos estão envolvidos na defesa química contra o ataque de herbívoros e microrganismos patogênicos, pois diminuem a palatabilidade pelo seu sabor adstringente, dificultam a digestão pela complexação com enzimas digestivas e proteínas do vegetal e formam produtos tóxicos no trato digestivo, a partir de sua hidrólise (SANTOS; MELLO, 2007).

O interesse por esses compostos aumentou quando foi sugerido que a ingestão de bebidas contendo taninos, como chá-verde e vinhos tintos, podem curar ou prevenir doenças. Também foi estudado que essas substâncias possuem atividade de estimulação de células fagocíticas, atividade tumoral hospedeiro-mediador e ações anti-infecciosas (COWAN, 1999). Plantas ricas em taninos são amplamente empregadas na medicina tradicional para diversos distúrbios funcionais, como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, problemas estomacais e alterações renais. E, ainda, são antioxidantes, sequestradores de radicais livres e interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2007).

3.4 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais, também denominados óleos etéreos (pela solubilidade em solventes orgânicos apolares) ou essências (pelo aroma agradável e intenso), são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas, líquidas e com densidade menor do que a da água, formados pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas. Os constituintes dos óleos podem ser baseados em uma estrutura teórica denominada de isopreno (COWAN, 1999), e variam desde hidrocarbonetos terpênicos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos), terpenos oxigenados (alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas), até compostos com enxofre e nitrogênio (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Estima-se que três mil óleos essenciais sejam conhecidos, sendo que aproximadamente 300 desses produtos voláteis são comercialmente importantes, destinados para a indústria de fragrâncias e de aromas (BURT, 2004).

Os óleos são misturas de 20 a 60 componentes, com concentrações variadas, caracterizados por dois ou três compostos principais de concentração entre 20 a 70% e outros elementos, em menor porcentagem, chamados traço (BAKKALI *et al.*, 2008).

Essas substâncias quase sempre possuem poder rotatório e apresentam índice de refração elevado. A extração normalmente é feita por arraste por vapor d'água (BRUNETON, 1991).

Os óleos são abundantemente encontrados nas angiospermas, como a família Myrtaceae. A distribuição desses metabólitos ocorre em diversas partes do vegetal e eles agem como inibidores da germinação, protetores contra predadores, atratores de polinizadores e protetores contra a perda de água e contra o aumento da temperatura (SIMÕES; SPITZER, 2007).

As plantas aromáticas e seus óleos essenciais têm sido utilizados desde a antiguidade, como temperos, fragrâncias, e como agentes antimicrobianos na medicina. Também são aplicados em plantações no controle de pragas e de espécies daninhas, já que são biodegradáveis e apresentam pouca ou nenhuma toxicidade aos vertebrados (BATISH *et al.*, 2008).

No Brasil, a produção de óleo essencial iniciou-se em meados de 1920, com o extrativismo de essências naturais. Mas, foi durante a segunda Guerra Mundial que

o país se organizou nessa atividade, incluindo, além de outras espécies, o cultivo do eucalipto (ÓLEOS, 2003).

Atualmente, o Brasil encontra-se entre os quatro principais países responsáveis pela produção de óleo essencial, ao lado da Índia, da China e da Indonésia. Essa colocação está relacionada aos óleos de frutos cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos, principalmente das laranjas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

3.4.1 Óleo essencial de eucalipto

São conhecidas cerca de 400 espécies de *Eucalyptus* que apresentam óleos voláteis de composições bastante diversificadas (SIMÕES; SPITZER, 2007). Dentre os principais constituintes do óleo essencial de *Eucalyptus* spp., dois deles são muito frequentes, o 1,8-cineol (eucaliptol) e o α -pineno (LAWRENCE, 1997⁴ apud BALACS, 1997).

A essência de eucalipto é um líquido incolor ou amarelado, às vezes castanho ou esverdeado, fluido, de odor forte e aromático próprio, e de sabor picante, primeiro quente e, em seguida, fresco (COSTA, 1975). Segundo DORAN e BROPHY⁵ apud VITTI e BRITO (2003), os óleos voláteis desse gênero ocorrem, principalmente, nas folhas, nas quais são produzidos em pequenas cavidades globulares, denominadas glândulas. Esses metabólitos secundários são formados por uma mistura complexa de componentes, envolvendo de 50 a 100, ou até mais, compostos orgânicos voláteis, como os hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres.

Os óleos essenciais de espécies de eucaliptos estão entre os 18 produtos voláteis mais comercializados no mundo (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). A essência de *Eucalyptus citriodora* Hooker, agora com denominação *Corymbia citriodora* (Hooker) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (GRIN, 2002), é uma das principais em termos de circulação comercial, por apresentar o componente citronelal. O óleo de

⁴ LAWRENCE, B. M. Progress in essential oils. **Perfumer and Flavorist**, v.22, p.49-51, 1997.

⁵ DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Inkata, 1991. p.11-28.

E. globulus é visado pela presença do composto medicinal 1,8-cineol em altas concentrações (GREEN, 2002⁶ apud BATISH *et al.*, 2008).

As três formas de uso do óleo essencial de eucalipto são na indústria alimentícia (doces e gomas de mascar), na perfumaria (perfumes, cosméticos, domissanitários e higiene pessoal) e na medicina (PENFOLD; WILLIS, 1961).

Na perfumaria, a principal espécie explorada, desde a segunda Guerra Mundial, é a *C. citriodora*. O principal componente do óleo volátil é o citronelal, um aldeído monoterpênico, usado na composição de produtos de limpeza, como sabões e desinfetantes e, também, como repelente de insetos. O óleo de *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex F.M. Bailey, que tem como composto principal o citral, também é explorado para essa função, mas em menor escala (VITTI; BRITO, 2003). O *Eucalyptus dives* Schauer apresenta como componente principal do seu óleo o felandreno, usado na fabricação de desinfetantes e desodorizantes, e a piperitona, da qual é produzido o timol e o mentol (VITTI; BRITO, 2003).

Em relação ao uso medicinal, no Brasil, as espécies cultivadas são o *E. globulus* e o *Eucalyptus smithii* F. Muell. ex R.T. Baker. O fator que determina a propriedade curativa do óleo é a composição majoritária (acima de 70%) de eucaliptol (1,8-cineol), um monoterpeneo com função éter (VITTI; BRITO, 2003). O óleo volátil de *E. globulus* é empregado por suas ações expectorante, antisséptica e flavorizante (SIMÕES; SPITZER, 2007). Segundo LORENZI e MATTOS (2002), ensaios de avaliação de sua atividade farmacológica demonstraram que essa essência é ativa contra microrganismos. BALACS (1997) sugere alguns usos terapêuticos do óleo essencial de eucalipto. Na pele, para o tratamento de pé-de-atleta, queimaduras e ulcerações; no trato respiratório, para resfriados, bronquites, faringite e sinusite; no sistema digestório, para síndrome da irritabilidade intestinal; no sistema urinário, para litíase renal e cistite, e também, para distúrbios de memória e desconcentração.

As essências de eucalipto também são utilizadas em saunas e banhos, como refrescantes de odores e para aliviar dores musculares, por meio de compressas quentes (BUSBY OILS, 2009).

⁶ GREEN, C. *Export development of essential oils and spices by Cambodia*. Kent: C. L. Green Consultancy Services, 2002.

No Brasil, existem outras espécies cultivadas que podem revelar potencial para a extração do óleo essencial, como o *Eucalyptus microcorys* F. Muell., cultivado em Goiás, que apresentou um elevado teor de 1,8-cineol (86,72%) (ESTANISLAU *et al.*, 2001). SILVA, BRITO e JÚNIOR (2006) estudaram nove espécies de eucalipto que não são empregadas comercialmente. O resultado demonstrou que, analisando-se o rendimento e os teores dos componentes principais de cada essência, o *Eucalyptus viminalis* Labill. possui condições de cultivo para uso medicinal.

Os representantes híbridos, originados do cruzamento de diferentes espécies de eucalipto, também são cultivados para a exploração do óleo essencial, pois com esse procedimento é possível aumentar a qualidade e a quantidade da essência, como aquelas ricas em 1,8-cineol. Nesse contexto, o Brasil é um dos principais países em cultivo de híbridos (TOLOZA *et al.*, 2008).

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *Eucalyptus*

Existe um grande interesse pela atividade biológica proveniente de espécies vegetais. O estudo referente a esse tema é necessário para que seja ampliado o entendimento da flora medicinal e seu real valor.

A maioria das pessoas utiliza as plantas em suas necessidades de cuidado diário com a saúde, cerca de 80% da população mundial confia nessa forma de tratamento segundo a WHO (*World Health Organization*), e o conhecimento sobre a forma de uso é, quase sempre, passado de uma geração para outra (GURIB-FAKIM, 2006). Portanto, o estudo das atividades biológicas das plantas é de extrema relevância, pois há uma utilização indiscriminada de plantas que ainda não foram cientificamente comprovadas como seguras.

Há muitas atividades biológicas atribuídas a certas espécies de eucaliptos. Os óleos essenciais das espécies *E. citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* apresentaram efeito acaricida contra o carrapato de bovinos, *Boophilus microplus*, nas concentrações médias de 17,5%, 15% e 12,5%, respectivamente (CHAGAS *et al.*, 2002).

O efeito repelente/inseticida também é conhecido. YANG *et al.* (2004) verificaram a ação piolhícida do óleo de *E. globulus* contra a espécie de piolho humano, *Pediculus humanus capitis*. As folhas de *E. citriodora* queimadas em

ambientes internos preveniram a entrada de mosquitos, agindo como repelente (SEYOUM *et al.*, 2003).

A nebulização do óleo essencial das espécies *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *E. citriodora*, em plantações, provocou a diminuição da germinação de espécies daninhas, como da espécie *Parthenium hysterophorus* L., demonstrando a ação herbicida dos óleos essenciais de eucalipto (KOHLI; BATISH; SINGH, 1998).

O extrato aquoso de *E. globulus* tem demonstrado um efeito hipoglicemiante quando incorporado na dieta, particularmente útil no tratamento do *Diabetes*. Um dos efeitos é decorrente da estimulação da secreção de insulina, provavelmente causada por mais de um componente ativo do extrato, além do eucaliptol (RÍOS; RECIO, 2005). Os compostos globulusina A e eucaglobulina, isolados do extrato aquoso quente dessa mesma espécie, apresentaram atividade antioxidante e antiinflamatória (HASEGAWA *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. globulus* e *Eucalyptus tereticornis* Sm., em concentrações variando de 0,1 a 100 mg/kg, testados em ratos, inibiram reações inflamatórias neutrófilo-dependentes e independentes. As atividades variaram de acordo com a composição específica do óleo volátil de cada eucalipto (SILVA *et al.*, 2003).

3.5.1 Atividade antimicrobiana

Com o número crescente de indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes portadores do vírus HIV, de leucemia, de linfoma e de *Diabetes mellitus*, o número de microrganismos oportunistas infecciosos também aumentou drasticamente em todo o mundo (JOHANN *et al.*, 2007). Um dos motivos é a administração contínua de um único antibiótico, que pode levar à seleção das cepas mais resistentes, como é o caso no uso do fluconazol e anfotericina B em pacientes com câncer (MAERTENS; BOOGAERTS, 2000). A tecnologia médica está cada vez mais avançada e os indivíduos estenderam as chances de sobrevivência, em contrapartida ficaram mais debilitados e susceptíveis às infecções (SCORZONI *et al.*, 2007).

A estatística revela que dois a três antibióticos derivados de microrganismos são lançados no mercado a cada ano, provando que há um limite na vida útil desses medicamentos (COWAN, 1999).

Existem muitos fármacos de síntese orgânica aplicados no tratamento de infecções micóticas, como os antissépticos tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, corantes, quinonas, derivados sulfamídicos e antifúngicos poliênicos. Dentre os antifúngicos modernos utilizados encontram-se os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol), hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium, anfotericina B lipossômica e alilaminas (naftina, terbinafina) (LIMA *et al.*, 2006).

Com exceção do 5-fluorocitosina, todos os agentes antifúngicos agem interferindo na estrutura ou na integridade funcional da membrana plasmática do fungo, sendo esta ação física ou por bloqueio da biossíntese dos esteróides da membrana, como o ergosterol. Os azóis são responsáveis por este tipo de atividade e atuam apenas limitando o crescimento do microrganismo, sendo, portanto, fungistáticos e com uso restrito a poucas espécies (MAERTENS; BOOGAERTS, 2000). Os polienos constituem a anfotericina B e a nistatina e atuam como fungicidas. Ligam-se ao ergosterol, mas podem se ligar ao colesterol da membrana das células dos mamíferos, provocando efeitos adversos, como febre, hipertensão arterial e vômitos (MARTINEZ, 2006).

Mesmo com inúmeras opções os fungos continuam adquirindo resistência, ou seja, continuam selecionando as cepas mais resistentes existentes no meio de uma população. No caso de infecção com *Cryptococcus neoformans*, a maioria das evoluções dos casos à meningite, verificado em pacientes com AIDS, é devido à resistência do fungo ao tratamento contínuo com fluconazol (ALVES *et al.*, 2001).

A resistência dos microrganismos pode ser natural, quando corresponde a uma característica da espécie, ou adquirida, quando somente uma parte das amostras é resistente. A aquisição dessa condição é devido a alterações genéticas que se expressam bioquimicamente. Dentre elas, podem-se citar mutações cromossômicas (normalmente atinge um antibiótico) e aquisição de plasmídios de resistência (o microrganismo resiste a dois ou mais antimicrobianos). Ainda, é possível a associação dessas duas alterações, verificadas comumente em espécies isoladas em hospitais, nos quais há intenso uso de antibióticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Por isso, centenas de estudos são feitos sobre a atividade antimicrobiana dos vegetais, esperando que os compostos das plantas atuem sobre sítios diferentes no

microrganismo. E ainda, a população está mais atenta aos riscos do uso abusivo de antibióticos tradicionais (COWAN, 1999).

Considerações sobre alguns gêneros mais comumente encontrados:

Gênero *Candida*: fungo mais comum em infecções humanas, com a possível exceção dos dermatófitos. Pode atingir vários tecidos e é comum em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores de linfoma, leucemia, *diabetes mellitus* e do vírus HIV. As espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* estão presentes nas áreas mucocutâneas normais da cavidade oral, gastrointestinal e vaginal (BOEKHOUT; GUÉHO, 2003), mas podem se tornar patogênicas de acordo com a condição imune do hospedeiro. A levedura *C. albicans* pode afetar a pele, as unhas, o esôfago, entre outras áreas do organismo. Na pele, a candidíase forma placas esbranquiçadas a amarelas ou cinzas, com áreas de ulceração demarcadas por inflamação de intensidade variável e é causada não só pela *C. albicans*, mas também pela *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (HIRSH; ZEE, 2003).

Gênero *Cryptococcus*: junto com o gênero *Candida* representam mais que 90% das infecções por leveduras em humanos. As manifestações clínicas podem abranger da formação assintomática de colônias no trato respiratório à disseminação sistêmica, dependendo do estado imune do indivíduo. O sistema nervoso é comumente atingido na disseminação (SCORZONI *et al.*, 2007). Esta levedura pode causar meningite, em pacientes imunodeprimidos. Além da meningite, esse fungo pode causar outros distúrbios, mais notavelmente pulmonares e infecções cutâneas (raras, decorrentes da disseminação sistêmica da infecção) (BOEKHOUT; GUÉHO, 2003). A espécie *Cryptococcus neoformans* é causadora da criptococose. É agente de micoses sistêmicas ou profundas, cuja infecção é principalmente causada por inalação (HIRSH; ZEE, 2003).

Gênero *Trichosporon*: esta levedura é encontrada na pele, nas unhas e na boca de indivíduos saudáveis. As infecções por este fungo são raras, mas podem ocorrer associadas com outras manifestações clínicas (SILVA *et al.*, 2008). As espécies patogênicas podem ser agentes de doenças superficiais, como piedra branca (cutânea) e duas delas, como o *T. asahii*, podem causar infecções disseminadas em pacientes debilitados (BOEKHOUT; GUÉHO, 2003).

Gênero *Rhodotorula*: possui espécies sem ou com pouca patogenicidade, mas quando atingem regiões estéreis do corpo humano podem se tornar agentes

causadores de fungemia (fungos no sangue) em pacientes imunodeprimidos como, por exemplo, aqueles com cateteres venosos. A espécie *Rhodotorula rubra* já foi isolada de pulmões, unhas, pele e linfonodos (BOEKHOUT; GUÉHO, 2003).

Gênero *Malassezia*: causador de pitiríase versicolor, vulgarmente conhecida como micose de praia ou pano branco. Espécies desse gênero também podem causar foliculites e dermatites. A espécie *Malassezia pachydermatis* é a única lipofílica do gênero hábil para crescer sem suplementação de ácidos gordos de longa cadeia ou seus ésteres. As colônias crescem bem em 37 °C e algumas colônias primárias apresentam certa dependência lipídica. Portanto, para sobrevivências epidemiológicas da espécie, em animais e humanos, é possível que utilizem algum suplemento lipídico. Essa espécie é rara em humanos, mas é conhecida como habitante normal da pele de mamíferos. Dermatites seborréicas e otites são doenças causadas por este patógeno oportunista, principalmente em cães (BOEKHOUT; GUÉHO, 2003).

Tem-se estabelecido cientificamente que aproximadamente 60% dos óleos essenciais apresentam atividade antifúngica e 35% propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992). As essências ainda podem apresentar atividade superior aos antifúngicos sintéticos comercializados (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2008; HEYDER; SILVA, 2004).

As pesquisas realizadas com as plantas, como alternativa no combate aos fungos patogênicos, têm revelado o potencial dos vegetais e seus princípios ativos. O estudo de produtos naturais ativos contra *Candida* spp. é um exemplo. Nos últimos dez anos aproximadamente 258 espécies de plantas foram investigadas (DUARTE *et al.*, 2005) e muitas delas apresentaram alguma atividade anti-*Candida*, como contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida guilliermondii* (GAZIM *et al.*, 2008; CHAIEB *et al.*, 2007; JOHANN *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2005; HEYDER; SILVA, 2004).

Muitos estudos já foram realizados com os eucaliptos, revelando o seu potencial antimicrobiano.

O extrato aquoso de *E. globulus* foi eficaz, inibindo o crescimento de todas as dez bactérias testadas por SRINIVASAN *et al.* (2001). As bactérias Gram-positivas estudadas foram *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e as Gram-negativas investigadas foram *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*

faecalis, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* e *Salmonella typhi*.

CIMANGA *et al.* (2002) testaram a ação antibacteriana do óleo essencial de várias espécies de ocorrência no Congo, e dentre elas, várias espécies de eucalipto. *Eucalyptus camadulensis* Dehnh. e *E. tereticornis* apresentaram os melhores resultados, inibindo 20 e 21 bactérias, respectivamente, das 22 cepas testadas, inclusive *Pseudomonas aeruginosa*, que é um microrganismo clínico muito resistente. *Eucalyptus robusta* Sm., *Eucalyptus alba* Reinw. ex Blume, *E. citriodora*, *Eucalyptus deglupta* Blume, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus saligna* Sm., também revelaram atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de 13 a 19 bactérias. Os óleos essenciais de *Eucalyptus propinqua* H. Deane & Maiden e *Eucalyptus urophylla* foram os menos ativos, inibindo menos de dez bactérias.

O óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., investigado por FRANCO *et al.* (2005), demonstrou o potencial antimicrobiano contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra o fungo *Candida albicans*, pelo método da difusão em ágar.

O óleo essencial de *E. globulus* inibiu o crescimento de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, fungos oportunistas que se instalam nos pulmões de pacientes imunocomprometidos, como aqueles com tuberculose (BANSOD; RAI, 2008). Esse mesmo óleo também apresentou um potencial antifúngico contra outras espécies do mesmo gênero, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (VILELA *et al.*, 2009).

O óleo volátil de *E. camaldulensis* apresentou eficácia contra o crescimento de dermatófitos, como *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* (FALAHATI; TABRIZIB; JHANIANI, 2005).

A ação biológica do eucalipto também é relevante para o uso no solo, combatendo doenças vegetais. O *E. citriodora* apresentou forte atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, causador do apodrecimento da raiz, contra *Alternaria solani*, fungo responsável pelo efeito de geada precoce nas plantas (RAMEZANI *et al.*, 2002), e contra outros fungos fitopatogênicos, como *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata* e *Colletotrichum sublineolu* (BONALDO *et al.*, 2007).

3.5.2 Atividade antioxidante

Os radicais livres são um produto natural do metabolismo aeróbico, sendo que 2 a 3% do oxigênio consumido pela célula são convertidos em radicais livres, que contêm um ou mais elétrons livres em sua órbita. A quebra do oxigênio no metabolismo celular produz esses agentes reativos que podem levar danos aos tecidos biológicos. A principal formação de radicais livres é nas mitocôndrias, onde o oxigênio é reduzido em várias etapas até a formação da água. Os principais produtos intermediários dessas reações são o ânion superóxido ($^{\bullet}\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}) (WICKENS, 2001), chamados de espécies reativas do oxigênio (ROS), mas também existem as espécies reativas do nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o ânion peroxinitrito (ONOO^-). O superóxido é formado quando quatro elétrons são transportados pela membrana mitocondrial para a formação de duas moléculas de água, e cerca de 1 a 2% desses elétrons se perdem no transporte, originando esses agentes reativos (PODDA; GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

O processo de envelhecimento celular está fortemente ligado aos radicais livres, e envolve fatores genéticos e ambientais, como a luz ultravioleta (UV), a radiação ionizada, os pesticidas, a fumaça do tabaco e os poluentes (SINGH *et al.*, 2009; PODDA; GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001). As ROS atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de formação de peróxidos lipídicos nas membranas celulares. Estes peróxidos podem causar alterações na fluidez e na elasticidade da membrana, e podem levar ao rompimento da célula, principalmente naquelas de vida-longa, como os neurônios (SOUSA *et al.*, 2007). YAMAMOTO (2001) observou em modelo experimental murino, durante irradiação UV, a formação de peróxidos lipídicos e o decréscimo nos níveis dos antioxidantes α -tocoferol, ácido ascórbico, ubiquinol-10 e glutathiona na pele, indicando a ocorrência da oxidação dos radicais livres frente a este fator. O DNA também pode ser afetado, e as lesões causadas acumulam-se com o passar do tempo e devem contribuir para o envelhecimento (WICKENS, 2001) e para o desenvolvimento de arteriosclerose, catarata, câncer, distúrbios cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (MOSQUERA; CORRERA; NIÑO, 2009).

Mas a célula é protegida por antioxidantes não-enzimáticos, como a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E (tocoferol), a cisteína, o ácido úrico, o β -caroteno e o α -tocoferol, e por fatores enzimáticos, como a catalase, o superóxido dismutase e a glutationala peroxidase/reductase (QIAN; NIHORIMBERE, 2004). Na epiderme humana são encontrados 31 nmol/g- tecido de α -tocoferol e 3 800 nmol/g- tecido de ácido ascórbico (YAMAMOTO, 2001). Entretanto, ao longo do tempo a disponibilidade desses componentes diminui, e é por isso que se recomenda uma dieta rica em frutos e vegetais, ou então a administração tópica ou oral de antioxidantes, para que estes se acumulem no organismo (PODDA; GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

Os antioxidantes naturais são substâncias que aumentam a resistência frente a oxidações prejudiciais no organismo, causando um impacto benéfico na saúde humana (DIMITRIOS, 2006). Essas substâncias podem atrasar ou inibir o início ou a propagação de uma reação oxidativa em cadeia e, então, prevenir ou reparar os danos causados pelo oxigênio às células do organismo (LI *et al.*, 2009).

Muitos estudos revelam que os extratos e as substâncias isoladas de espécies vegetais apresentam atividade antioxidante, principalmente pela ação dos compostos fenólicos e, também, pelo efeito dos óleos essenciais (LI *et al.*, 2009; RAMALAKSHMI; KUBRA; RAO, 2008; OZKAN; SIMSEK; KULEASAN, 2007; IHA *et al.*, 2008; BAYDAR; OZKAN; YASAR, 2007). Nesse aspecto, algumas espécies de eucaliptos já demonstraram poder antioxidante.

Os taninos e os flavonóides, como glicosídeos acilados, todos com grupos galoila, presentes no extrato de folhas de *Eucalyptus rostrata* Cav., apresentaram alta atividade antioxidante, maior que o fármaco sintético usado como controle (OKAMURA *et al.*, 1993).

O componente volátil timol, presente no extrato de *Eucalyptus polyanthemos* Schauer, exibiu atividade antioxidante, do tipo dose-dependente, quando comparado ao antioxidante sintético usado no controle α -tocoferol (vitamina E), por meio da técnica de conversão aldeído/ácido carboxílico. Este método baseia-se na auto-oxidação de aldeídos ao ácido carboxílico correspondente, por meio de um oxigênio ativo, como um radical hidroxila, durante o período de 30 dias. Outros componentes dos extratos, como o 1,8-cineol (eucaliptol), o álcool benzílico e o terpineno-4-ol, também contribuíram para o potencial antioxidante da planta (LEE; SHIBAMOTO, 2001).

OSAWA e NAMIKI (1985) verificaram a ação antioxidante de uma β -dicetona obtida da cera de folhas de *E. globulus*. Nessa mesma espécie, foi verificada a capacidade antioxidante nos extratos das cascas (VÁZQUEZ *et al.*, 2008), no extrato aquoso das folhas (ALMEIDA *et al.*, 2009) e no extrato acetato de etila, obtido após a hidrólise ácida da madeira (CRUZ; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 2005).

O extrato clorofórmico e os compostos isolados, obtidos da resina proveniente do caule de *Eucalyptus maculata* Hook., revelaram potencial antioxidante, pois mantiveram o nível de ácido ascórbico no sangue de ratos testados (MOHAMED *et al.*, 2005).

3.6 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Eucalyptus globulus* LABILL. ssp. *bicostata* (MAIDEN *et al.*) J. B. KIRKPAT.

O enquadramento taxonômico de *E. globulus* ssp. *bicostata* está apresentado no Quadro 1.

QUADRO 1 - TAXONOMIA DE *Eucalyptus globulus* LABILL. ssp. *bicostata* (MAIDEN *et al.*) J. B. KIRKPAT.

ENGLER (1964)	CRONQUIST (1981)	APG II (2003)
Divisão Angiospermae	Divisão Magnoliophyta	Angiospermas
Classe Dicotyledoneae	Classe Magnoliopsida	Eudicotiledôneas
Subclasse Archichlamydeae	Subclasse Rosidae	Eudicotiledôneas Nucleares
Ordem Myrtiflorae	Ordem Myrtales	Rosídeas
Família Myrtaceae	Família Myrtaceae	Ordem Myrtales
Gênero <i>Eucalyptus</i>	Gênero <i>Eucalyptus</i>	Família Myrtaceae
Espécie <i>Eucalyptus globulus</i>	Espécie <i>Eucalyptus globulus</i>	Gênero <i>Eucalyptus</i>
Subespécie <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	Subespécie <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>	Espécie <i>Eucalyptus globulus</i> Subespécie <i>Eucalyptus globulus</i> ssp. <i>bicostata</i>

FONTE: ENGLER, 1964⁷ apud JOLY, 1998; CRONQUIST, 1981⁸ apud UNITED, 2009; APG II, 2003.

⁷ ENGLER, A. *Syllabus der pflanzenfamilien*. Berlin: Gebruder, 1964.

⁸ CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981.

3.7 *Eucalyptus globulus* LABILL. ssp. *bicostata* (MAIDEN *et al.*) J. B. KIRKPAT.

Uma das espécies de eucalipto com maior distribuição mundial é a *E. globulus*, sendo que uma grande parcela das árvores corresponde a seus híbridos ou subespécies (JIROVETZ *et al.*, 2007).

Segundo BOLAND, BROPHY e HOUSE⁹ apud VITTI e BRITO (2003), a subespécie *bicostata*, em sua área nativa na Austrália, ocorre em regiões montanhosas dos estados de Nova Gales do Sul e Vitória. Antigamente foi denominada de *Eucalyptus bicostata* Maiden, Blakely & Simmonds ou *Eucalyptus stjohnii* F. Muell. ex R.T. Baker. Em 1974, Kirkpatrick a enquadrou como uma subespécie, por possuir semelhanças quanto à botânica e à silvicultura do *E. globulus* (FAO, 1981).

A latitude em que se encontra está entre 31 a 40 °S, e a altitude varia desde o nível do mar até 1 200 m. A subespécie ocorre em regiões com estações uniformes de chuva, sendo a precipitação entre 750 a 1 250 mm. A temperatura tolerante máxima, em meses quentes, em média, é de 21 a 27 °C, e nos meses mais frios, pode tolerar até -9 °C. O número de dias que suporta com temperaturas negativas varia de 25 a 40 por ano (FAO, 1981).

É uma árvore de médio a grande porte, com cerca de 40 m. As folhas jovens são opostas, sésseis, ovaladas a lanceoladas, glaucas, apresentam cor pálida na superfície abaxial e o ramo quadrangular (Figura 4). As folhas adultas são de coloração verde-escura, alternas, pecioladas, geralmente curvas e lanceoladas. A casca apresenta coloração azul-acinzentada a cinza-esbranquiçada, com pequena quantidade persistente na base da árvore. A madeira é forte e moderadamente durável, sendo muito parecida com a do *E. globulus* e do *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *maidenii* (F. Muell.) J. B. Kirkpat. As sementes viáveis por grama são, em média, 106. Frequentemente, o *E. globulus* ssp. *bicostata* é cultivado como ornamental em áreas da Austrália, principalmente em Camberra, para sombra e abrigo e, também, pela beleza das folhas, que são largas e diferem na coloração entre jovens e adultas (FAO, 1981; PENFOLD; WILLIS, 1961).

⁹ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.



FIGURA 4 - RAMO DE FOLHAS JOVENS E DETALHE DO CAULE DE *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata*. Fonte: o autor

Apresenta inflorescência axilar, com três flores do tipo umbela. O pedúnculo é longo. Os botões são glaucos ou, ocasionalmente, verdes, sésseis ou pedicelados. O opérculo é pontudo ou rostrado. Os frutos são ovóides a campanulados ou cônicos, glaucos e estão em pedicelos curtos ou quase sésseis (PENFOLD; WILLIS, 1961).

As gemas e os frutos podem ser observados na Figura 5.

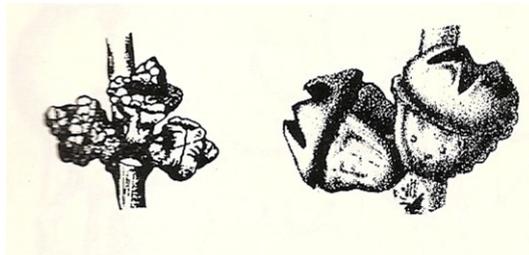


FIGURA 5 - GEMAS E FRUTOS DO *E. globulus* ssp. *bicostata*. Fonte: FAO, 1981

Segundo GUENTHER (1961), o rendimento do óleo essencial da subespécie *bicostata* varia de 1,14 a 2,4% (material seco), a densidade específica 15 °/15 ° é de 0,9171 a 0,9336, a rotação óptica α_D (100 mm) varia entre +6,4° e +20°, o índice de refração a 20 °C corresponde entre 1,4657 e 1,4804, a solubilidade em álcool/água (álcool 70%) é de 1,1 a 1,5 vol. e os principais constituintes são o 1,8-cineol (38 a 65%), o D- α -pineno e o eudesmol.

Possivelmente, essa subespécie é mais adaptada que o *E. globulus* em regiões mais frias e mais secas (FAO, 1981), apesar das características do *E. globulus* ssp. *bicostata* assemelharem-se as do *E. globulus* e do *E. globulus* ssp.

maidenii (PENFOLD; WILLIS, 1961). As diferenças podem ser notadas nos frutos, enquanto o *E. globulus* apresenta um único fruto, a subespécie *bicostata* apresenta de dois a três, e ainda as folhas jovens da segunda são mais orbiculares (FAO, 1981; FAO, 1955).

PENFOLD e WILLIS (1961) observaram que, avaliando a altura das árvores, o híbrido entre *E. globulus* ssp. *maidenii* e *E. globulus* ssp. *bicostata* obteve um crescimento 12% melhor do que o cruzamento entre apenas representantes da subespécie *maidenii* e 20% melhor do que entre apenas exemplares da subespécie *bicostata*.

3.7.1 *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* cultivado fora da área nativa

A subespécie é cultivada em países da América Latina, como o Chile, o Uruguai e a Argentina. É encontrada também na Espanha, na Turquia e no Marrocos. O principal uso é a madeira, principalmente para a indústria de papel e de celulose. Porém, países como a Argentina extraem o óleo essencial (FAO, 1981).

Alguns estudos sobre a composição do óleo essencial das folhas dessa subespécie já foram realizados, revelando o 1,8-cineol como componente majoritário (MANTERO *et al.*, 2007; VITURRO; MOLINA; HEIT, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 1988; DAYAL; AYYAR, 1986).

A associação das raízes de *E. globulus* ssp. *bicostata* com fungos (ectomicorrizas) também foi explorada. DITENGOU, BÉQUIRISTAIN e LAPEYRIE (2000) verificaram que o crescimento da raiz da árvore é inibido pela hipaforina, principal composto indólico isolado do fungo *Pisolithus tinctorius*.

3.7.2 *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* no Brasil

O *E. globulus* ssp. *bicostata* foi pouco investigado no Brasil. O estado do Rio Grande do Sul é o mais representativo em pesquisas relacionadas ao eucalipto.

Em Butiá (RS), SCHUMACHER (1998) estudou a biomassa e os nutrientes de um povoamento da subespécie. O resultado revelou que a biomassa da casca e da madeira soma 73%, enquanto os 27% restantes representam a copa. Entretanto, as folhas possuem maior quantidade de nutrientes da concentração total, sendo 60% N, 41,5% P, 32% K, 25% Ca e 36% Mg.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Para a realização deste trabalho foi utilizado um mesmo exemplar de uma parcela de 20 árvores de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* (Maiden *et al.*) J. B. Kirkpat. cultivadas e localizadas no campo experimental da Embrapa Florestas (Colombo-PR). As sementes são da procedência Temara (Austrália) e foram plantadas em 1984.

O local de coleta encontra-se na região bioclimática 1 do Paraná, localizada no centro-sul do Estado, com altitudes entre 650 e 1 100 m. A vegetação é do tipo floresta ombrófila (mista de araucária e latifoliadas) e campos submontanos. A temperatura apresenta média anual entre 15 e 19 °C e a mínima absoluta, entre -5 e -10 °C, com ocorrência de 1 a 40 geadas por ano. A precipitação média anual varia de 1 250 a 2 500 mm, com distribuição parcial ou totalmente uniforme e sem déficit hídrico (EMBRAPA, 1986).

Foram feitas quatro coletas sazonais (primavera, verão, outono e inverno), nos anos de 2008 e 2009, para avaliar se havia variação do rendimento e da composição química do material durante as diferentes estações do ano.

Foram coletadas folhas jovens, as quais foram manualmente separadas dos galhos. O material coletado foi dividido em duas amostras, uma foi mantida em temperatura ambiente e à sombra para secar e outra foi utilizada fresca, ou seja, recém-coletada. O tempo de espera para secagem e utilização do material foi de quinze dias.

A identificação da espécie foi realizada por meio de comparação com a exsiccata que se encontra sob o número de registro 896 no Herbário da Embrapa Florestas, Município de Colombo-PR. As coletas foram realizadas segundo o Quadro 2.

QUADRO 2 – CONTROLE DAS COLETAS E DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

ESTAÇÕES PESQUISADAS	DATAS DA COLETA	HORA DA COLETA	TEMPERATURA MÉDIA DIÁRIA (°C)
PRIMAVERA	19/nov/2008	11h	21
	28/nov/2008	10h45min	23
VERÃO	15/mar/2008	10h30min	24
	22/jan/2009	10h45min	25
OUTONO	20/jun/2008	11h40min	22
INVERNO	05/ago/2008	11h40min	19

4.2 Caracterização morfoanatômica de *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata*

Para a análise das dimensões do comprimento e da largura do limbo foliar foram mensuradas dez folhas e obtida a média.

Os ramos jovens foram coletados e algumas lâminas foliares foram selecionadas a partir do quinto nó, do ápice em direção à base do ramo. Com o auxílio de uma lâmina cortante, à mão livre, foram realizadas diferentes secções nas folhas, da porção mediana e da extremidade do limbo e da nervura mediana. Os materiais foram imersos por dois dias para a fixação em uma solução de F. A. A. (ácido acético glacial-formaldeído-álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940) e, então, foram armazenados em álcool etílico 70%. Duas regiões da folha foram consideradas: o limbo e a nervura, uma vez que as folhas jovens são sésseis.

Para a análise ultra-estrutural, em microscópio eletrônico de varredura (MEV), as secções, em etanol 70%, passaram por uma desidratação etanólica ascendente (álcool etílico 90% e absoluto), sendo depois realizado o ponto crítico e a metalização com ouro (SOUZA, 1998), para a observação no microscópio. Foi feita, também, a caracterização com o material seco, que nesse caso passou apenas pela metalização com ouro. Os cortes preparados foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura Philips XL 30, com o detector *Secondary Eletrons*.

4.2.1 Montagem das lâminas semipermanentes

Foram preparadas lâminas semipermanentes por meio de secções paradérmicas (faces abaxial e adaxial) e transversais do material fresco, à mão livre

com o uso de uma lâmina cortante (BERLYN; MIKSCHE, 1976). O material foi corado com azul de astra e fucsina básica (BRITO; ALQUINI, 1996). As lâminas foram montadas em solução de glicerina a 50% (v/v) em água purificada e a lutagem foi feita com esmalte de unha incolor. A partir do material fresco, foram efetuadas secções transversais para a realização dos testes histoquímicos, com os seguintes reativos: glicerina iodada para avaliar a presença de amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976), Sudam III para compostos lipídicos (SASS, 1951), floroglucina clorídrica para lignina (FOSTER, 1949), ácido sulfúrico a 10% para verificar a origem do cristal (OLIVEIRA; AKISUE, 1997) e cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940).

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX 40, e fotografadas em microscópio óptico Olympus BX 50. As escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

4.2.2 Montagem das lâminas permanentes

A montagem foi realizada por meio da técnica de inclusão em glicol-metacrilato (FEDER; O'BRIEN, 1968).

Para a preparação das lâminas permanentes, o material fixado e armazenado em álcool etílico 70% foi desidratado em álcool etílico 95% por 30 minutos. De forma sintética, as etapas para o preparo da amostra foram: parainfiltração, infiltração e polimerização. A partir do material embocado foram obtidas secções transversais, de 7 a 10 μm de espessura, da região do limbo foliar e da nervura mediana. O micrótomo utilizado foi o Olympus CUT 4055 com navalha modelo C. As secções foram hidratados, distendidos em lâminas e secos em mesa térmica. A coloração aplicada foi o azul de toluidina (SAKAI, 1973) e a lutagem foi realizada com Permout[®].

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico Olympus BX 50. As escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

4.3 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado segundo WHO (1998). Uma alíquota das folhas secas (3 g) foi colocada em uma placa de petri previamente dessecada e pesada. A amostra permaneceu em estufa a 105 °C, continuamente até que a massa das folhas fosse constante. Consideraram-se os 3 g como 100% da massa, e a porcentagem de substâncias voláteis foi definida pela subtração do valor de 3 g pelo valor de massa após o peso constante. Como o óleo essencial foi evaporado nesse processo, juntamente com a água, determinou-se a massa do óleo através da relação $d=m/v$, onde v = rendimento do óleo obtido na extração e d =densidade do óleo e diminuiu-se o valor do total da porcentagem de substâncias voláteis encontradas. Assim obteve-se apenas o valor da quantidade de água evaporada. A determinação foi realizada em triplicata e a média foi calculada entre os três valores de umidade encontrados.

4.4 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v)

Em 40 g de folhas secas, trituradas a pó grosso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) em um fragmentador, foram acrescentados 200 ml de etanol 70% (v/v). Essa solução permaneceu em maceração a frio por dez dias. Após esse período, o material foi filtrado e completado o seu volume até 200 ml. Com o extrato foram realizadas as determinações organolépticas: cor, odor, sabor e pH, além da verificação do teor de resíduo sólido em porcentagem. Ao resíduo foram acrescentados mais 200 ml de etanol 70%, e o mesmo foi levado ao banho-maria (60 °C) durante 2 horas. Após filtração, foram acrescentados 200 ml de etanol 50%, e o mesmo procedimento foi adotado (NAKASHIMA, 1993).

As frações, com diferentes concentrações etanólicas, foram reduzidas no rotaevaporador. Os volumes, então, foram reunidos para o início da extração líquido/líquido em funil de separação, com solventes de diferentes polaridades. Foram efetuados quatro fracionamentos, sendo que o primeiro líquido extrator foi o mais apolar, o éter de petróleo (F1). Foram realizadas dez extrações com o mesmo solvente, utilizando 20 ml em cada vez, totalizando 200 ml de fração éter de petróleo. A cada etapa do fracionamento, após a extração, o volume do extrato restante foi levado ao banho-maria (60 °C) para que houvesse a evaporação total do solvente extrator.

O segundo fracionamento foi conduzido com o *n*-hexano (F2). O procedimento foi o mesmo para F1. O próximo líquido extrator foi o clorofórmio (F3). A partir do quarto fracionamento foram empregados solventes mais polares, como o acetato de etila (F4). O último fracionamento foi com etanol 70% (F5). Nessa etapa final, após a evaporação completa do solvente F4, o extrato foi reconstituído com etanol 70%, até completar o volume de 200 ml, para originar o F5 (NAKASHIMA, 1993). O fracionamento foi realizado porque pesquisas diretamente caracterizadas no extrato bruto podem mascarar o resultado, e os testes realizados com as frações possibilitam reações mais nítidas.

Com as frações, devidamente armazenadas sob refrigeração, foram realizados os ensaios fitoquímicos.

4.5 Preparo do extrato aquoso a 20% (p/v)

Em 40 g de folhas secas, trituradas a pó grosso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) em um triturador, foram acrescentados 200 ml de água destilada. A solução permaneceu em maceração no banho-maria (60 °C) durante 24 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado. Realizaram-se as determinações organolépticas: cor, odor, sabor e pH, além da verificação do teor de resíduo sólido em porcentagem. O extrato foi refrigerado para a investigação dos testes fitoquímicos (NAKASHIMA, 1993).

4.6 Ensaios fitoquímicos das frações do extrato hidroalcoólico a 20%

Os ensaios realizados com as frações obtidas do extrato hidroalcoólico 20% seguiram os métodos citados por NAKASHIMA (1993).

Os metabólitos secundários pesquisados qualitativamente foram os glicosídeos flavônicos (reações de Shinoda, com zinco, oxalo-bórica e de Pacheco), esteróides e/ou triterpenóides (reações de Xantidrol, Baljet, Kedde, Keller-Killiani, Legal e Tollens), leucoantocianidinas, alcalóides, glicosídeos antraquinônicos (reação de Bornträger), cumarinas, taninos, glicosídeos saponínicos, glicosídeos antociânicos e aminoácidos.

4.7 Ensaio fitoquímico do extrato aquoso a 20%

Segundo os métodos descritos por NAKASHIMA (1993) foram efetuados os ensaios com o extrato aquoso 20%.

Foram pesquisados qualitativamente taninos, por meio da utilização dos reagentes: cloreto férrico 1%, sulfato de ferro amoniacal 5%, cloridrato de emetina, gelatina 2,5% a 0,9% em NaCl, cianeto de potássio, ácido nitroso, dicromato de potássio e formol-clorídrico.

A presença de ácidos fixos, aminogrupos e glicosídeos cianogênicos também foi pesquisada.

4.8 Determinação de fenólicos totais

Para a determinação de fenólicos totais, o método utilizado foi o descrito por WANG, LEE e PENG (1997), com modificações.

A técnica baseia-se na intensidade da cor azul, formada pela redução do reagente fosfotúngstico-fosfomolibdico (reativo Folin-Ciocalteu) em presença de álcali (carbonato de cálcio). A reação determina fenóis pela ocorrência de hidroxilas fenólicas.

Uma amostra de 1 g de folhas secas cominuídas foi submetida à extração com solução aquosa de acetona a 80% por 1 hora (3x), utilizando 30 ml do solvente em cada etapa. A extração foi realizada sob agitação no aparelho de ultrassom, sendo que após o tempo de 1 hora o volume foi filtrado com papel de filtro e reservado. O volume final foi ajustado para 100 ml em um balão volumétrico com o mesmo solvente, originando o extrato fenólico na concentração de 1 g% (SM). A partir da SM foi feita uma diluição para 300 µg/ml, a qual foi testada.

Para a reação foi empregado 1 ml do extrato, 1 ml do reagente de Folin-Ciocalteu, 5 ml do reagente de carbonato de sódio a 20% (aquoso) e q.s.p. 10 ml de água destilada. Após 20 minutos da adição do último reagente foi feita a leitura no espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601 em 735 nm. Como branco foi usada água destilada. O procedimento foi feito em triplicata.

Nesse método, a ação do reativo forma um complexo instável com os fenóis, por isso a leitura das amostras foi realizada no tempo pré-determinado (20 minutos).

O padrão utilizado foi o ácido gálico, o qual foi submetido ao mesmo tratamento, nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Considerando a curva analítica do padrão, substituiu-se o valor de y da equação da reta pelo valor da absorvância da amostra. O resultado da quantificação de fenólicos totais foi expresso em mg em equivalentes de ácido gálico/g de amostra.

4.9 Extração do óleo essencial

Foram realizadas extrações das folhas frescas e secas de todas as coletas sazonais de um exemplar de *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata*. A extração foi efetuada pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, utilizando o aparelho de Clevenger modificado por WASICKY¹⁰ apud FABROWSKI (2002) em aparelho de destilação baseado na FARMACOPÉIA Brasileira (1988).

Cem gramas de folhas fragmentadas com tesoura, com tamanho de aproximadamente 1 cm, foram pesadas e colocadas em um balão volumétrico, juntamente com pedaços de porcelana para regularizar a ebulição. Acrescentou-se água destilada, até 15 vezes o volume das folhas frescas e 20 vezes para as folhas secas. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger e mantido sobre uma manta térmica a 95 °C, aproximadamente. Assim que a primeira gota de óleo foi visualizada no tubo com escala graduada, foi marcado o tempo de aproximadamente 6 horas de extração. Ao final, o rendimento do óleo foi determinado em % v/m, isto é, volume (ml) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Então, o óleo foi armazenado em uma proveta com rolha esmerilhada e levado ao congelador para os testes posteriores.

4.10 Análises físico-químicas do óleo essencial

As determinações desenvolvidas com as amostras de óleo essencial extraído foram baseadas nas principais constantes físico-químicas, e seguiram a metodologia da FARMACOPÉIA Brasileira (1988). Apenas a determinação da solubilidade em etanol foi conduzida conforme o método da PHARMACOPEA Helvetica (1993).

¹⁰ WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger 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.

4.10.1 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa foi determinada por picnometria. O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a mesma temperatura e com o mesmo volume, resultou no valor da densidade relativa.

4.10.2 Determinação do índice de refração

Essa determinação foi realizada em refratômetro ABBE da marca ausJENA. A temperatura permaneceu ajustada e mantida constante (24 °C).

4.10.3 Determinação da solubilidade em etanol

A solubilidade foi determinada em etanol a 70%, a 80%, a 90% e em etanol absoluto. Em um tubo de ensaio com 0,1 ml de óleo essencial, utilizando uma bureta de 25 ml, o etanol foi gotejado lentamente no óleo até que houvesse a solubilização total da amostra. Então, a leitura do volume de etanol gasto na bureta foi feita para se obter a proporção de solubilidade.

4.11 Análises estatísticas do rendimento do óleo essencial

As análises estatísticas foram efetuadas pelo teste ANOVA e DMS (diferença mínima significativa). No DMS, as médias foram comparadas, sendo um teste adicional de significância aplicado após a análise de variância (KOEHLER, 1996).

Para resultados significativamente diferentes considerou-se $p \geq 0,01$.

Essas análises foram conduzidas para a avaliação do rendimento do óleo essencial extraído frente à sazonalidade, tanto no grupo das folhas frescas como no grupo das folhas secas.

4.12 Análises cromatográficas

As cromatografias foram realizadas com o óleo essencial, segundo o preconizado WAGNER, BLADT e ZGAINSKI (1983) e STAHL (1969).

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial foram investigadas por meio do cromatógrafo gasoso GC-17A SHIMADZU equipado com o detector seletivo de massas GCMS-QP5050; coluna ZB - 1 ms; série 106383; coluna de capilaridade (60 m x 0,25 mm x 1 μ m). Pressão da coluna Inlet 68,4 kPa; fluxo da coluna 0,5 ml/min; velocidade linear 18,8 cm/s; razão de split de 96 e com o fluxo total de 52,8 ml/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C, sendo a da coluna de 50 °C, com rampa de aquecimento de 3 °C/min, temperatura máxima de 360 °C e temperatura do auxiliar de 250 °C. O hélio foi usado como gás de arraste, a 1 ml/min. As amostras de óleo essencial, extraídas de folhas frescas e secas, referentes às coletas da primavera, verão, outono e inverno, foram solubilizadas em *n*-hexano para as análises. O volume injetado foi de 1,0 μ l. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por comparação com os espectros da biblioteca NIST107.LIB.

Paralelamente, foi realizada a análise qualitativa do óleo volátil para verificar a presença de 1,8-cineol, por meio da cromatografia em camada delgada (CCD). A fase fixa utilizada foi a sílica gel GF254 e a fase móvel foi hexano: éter etílico: acetato de etila (80: 20: 0,5). Foram aplicados, separadamente, na cromatoplaça 10 μ l da amostra e o mesmo volume do padrão-referência 1,8-cineol. O cromatograma foi desenvolvido em um percurso de 15 cm. Os solventes foram evaporados ao ar e a placa foi nebulizada com vanilina sulfúrica e aquecida em estufa por 10 minutos para a revelação dos compostos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996).

4.13 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi estudada pelo método fosfomolibdênico e pelo ensaio do DPPH, testando-se o óleo essencial das folhas frescas coletadas no inverno e o extrato etanólico e metanólico de folhas secas.

4.13.1 Método fosfomolibdênico

Este método corresponde na redução do Mo (molibdênio) VI em Mo V, e na formação de um complexo verde-fosfato/Mo V em pH ácido, por meio de um agente redutor. Por esse procedimento foi verificada a capacidade antioxidante total da amostra (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Após os extratos etanol absoluto e etanol 70% terem sido preparados, foi feita a diluição para 200 µg/ml. O mesmo procedimento foi realizado com o óleo essencial bruto, que foi diluído a esta mesma concentração em etanol.

Para o preparo dos extratos, 100 g de folhas trituradas foram divididos em dois cartuchos de papel de filtro (50 g em cada) com algodão nas extremidades. Cada cartucho foi colocado em um aparelho de Soxhlet, sob refluxo, e acoplado a um balão de vidro sob aquecimento em manta térmica. O primeiro líquido extrator utilizado foi o *n*-hexano, para que houvesse o desengorduramento da amostra, ou seja, a extração dos óleos e dos lipídeos. As folhas permaneceram em extração contínua até que o extrato se tornasse límpido. Após essa fase, os cartuchos foram retirados e secos em temperatura ambiente e, então, o mesmo processo foi repetido com etanol absoluto. Quando o líquido se tornou parcialmente límpido, este foi retirado do balão e filtrado com funil e algodão, e foi acrescentado mais solvente no balão. Esse procedimento foi realizado para evitar a saturação do solvente e foi repetido até que ocorresse o esgotamento total dos metabólitos desejados. Ao fim da extração, as frações reunidas foram concentradas à secura no rotaevaporador. O material seco foi ressuspendido em um volume conhecido do mesmo solvente e a concentração da amostra foi determinada. Em seguida, foi utilizado o solvente etanol 70% e o mesmo processo foi adotado, totalizando dois extratos (etanol absoluto e etanol 70%) para a realização da atividade antioxidante.

Foi testada a concentração 200 µg/ml, tanto para os extratos etanólicos quanto para o óleo essencial, sendo que este último foi diluído com etanol, a partir do óleo bruto. Em 0,3 ml de cada uma das amostras foram acrescentados 3 ml do reativo, contendo molibdato de amônio 4 mmol/l, fosfato de sódio 28 mmol/l e ácido sulfúrico 0,6 mol/l (1:1:1), todos preparados em água destilada. Os tubos de ensaio, hermeticamente fechados, foram mantidos no banho-maria a 95 °C durante 90 minutos. Em seguida, após o resfriamento, foi feita a leitura das soluções em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601 a 695 nm. O branco correspondeu a 0,3 ml do solvente + 3 ml do reativo, sendo que o aparelho foi zerado com o solvente. Como padrões, foram utilizados o ácido ascórbico (diluído em água destilada) e a rutina (diluída em metanol), ambos a 200 µg/ml, sendo que o ácido ascórbico foi considerado 100% da atividade antioxidante para fins de cálculo. Os testes foram realizados em triplicata.

Cálculo da atividade antioxidante: % de atividade antioxidante = $\frac{\text{absorvância da amostra} - \text{absorvância do branco}}{\text{absorvância do ácido ascórbico} - \text{absorvância do branco}} \times 100$.

O método é somente quantitativo quando a atividade antioxidante é expressa como o número em equivalentes do padrão (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Neste estudo foi realizada apenas uma comparação da atividade das amostras com a atividade dos padrões, estando ambos nas mesmas concentrações, por isso foi uma determinação qualitativa.

4.13.2 Método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

O método foi baseado em BLOIS (1958), modificado por BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSSET (1995), considerando a redução do radical livre estável DPPH a partir da doação de um hidrogênio ou de um elétron da amostra, com a descoloração do meio rosa para amarelo, devido ao pareamento gradativo dos elétrons de DPPH disponíveis (Figura 6).

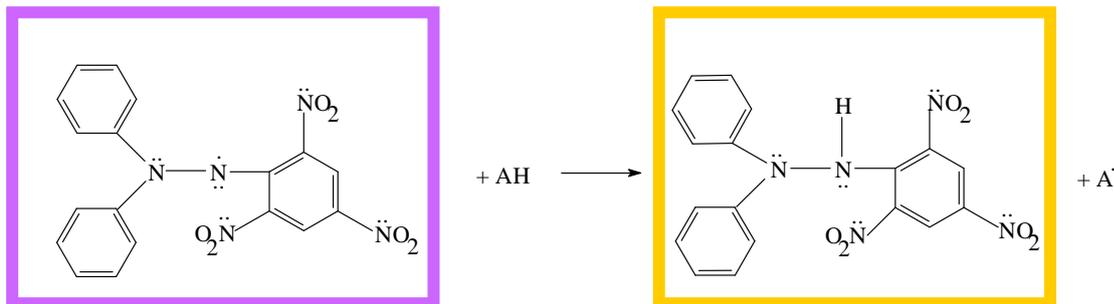


FIGURA 6 – MOLÉCULA DE DPPH, ANTES E DEPOIS DE RECEBER UM ELÉTRON.

Apesar da reação com o DPPH ser normalmente rápida, como o ácido ascórbico que age em menos de um minuto, algumas substâncias antioxidantes apresentam cinética diferenciada. O BHT (butil-hidroxitolueno) e o BHA (butil-hidroxianisol) podem levar algumas horas para reagir. Já a vitamina E reage em posição intermediária (5 a 30 minutos). A resposta para essa diferença pode ser pelo impedimento estérico do DPPH e também pela presença e pelo número de hidroxilas (quanto mais hidroxilas maior a atividade) existentes nas moléculas antioxidantes, que doam o hidrogênio para a estabilização do radical livre (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

Foi testada a atividade do óleo essencial em concentrações de 0,6 a 6 mg/ml em etanol, partindo-se de uma concentração de 10 mg/ml.

Para o teste com o extrato das folhas, partiu-se do material liofilizado, ressuspendido em metanol absoluto, o qual proporcionou uma melhor solubilidade da amostra, e diluído a partir da concentração 10 $\mu\text{g/ml}$ para as concentrações de 5, 4, 3, 2 e 1 $\mu\text{g/ml}$.

Para o preparo do extrato, 100 g de folhas permaneceram em maceração em água destilada por 5 horas no banho-maria a 60 °C. O volume foi filtrado em papel de filtro, distribuído em recipientes para posterior congelamento e submetido à liofilização. O material liofilizado foi mantido sob temperatura de -10 °C.

Inicialmente foi avaliada a cinética da reação. Para o óleo essencial utilizou-se a concentração de 6 mg/ml e para o extrato metanólico, 5 $\mu\text{g/ml}$. Em 3 ml dessas amostras foi adicionado 0,1 ml de DPPH a 1 mmol/l. A amostra foi homogeneizada rapidamente e a leitura no espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601, zerado com o solvente etanol (na amostra de óleo essencial) ou com metanol (na amostra do extrato metanólico), foi realizada em 517 nm a cada 15 minutos (óleo essencial), e a cada 5 minutos (extrato), até a estabilização do resultado, ou seja, até que o valor da absorvância permanecesse constante.

Para a determinação do EC_{50} , 3 ml das amostras, nas diversas concentrações, foram acrescentados de 0,1 ml de DPPH a 1 mmol/l e agitados rapidamente. O branco correspondeu a 3 ml da amostra e 0,1 ml de etanol ou metanol. O controle negativo foi feito com 3 ml do solvente e 0,1 ml de DPPH a 1mmol/l. Após 5 horas (óleo volátil), e 45 minutos (extrato metanólico), tempos definidos pela cinética reacional, foi efetuada a leitura no espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1601 em 517 nm. O aparelho foi zerado com o solvente. Os testes foram feitos em triplicata.

O EC_{50} dos padrões de ácido ascórbico (vitamina C) e de rutina foram determinados da mesma maneira que para as amostras. A concentração do ácido ascórbico testada foi entre 0,078 e 5 $\mu\text{g/ml}$, e da rutina entre 0,625 e 5 $\mu\text{g/ml}$, ambos diluídos em etanol.

Cálculo da atividade antioxidante: % da atividade antioxidante = $100 - \frac{(\text{absorvância da amostra ou padrão} - \text{absorvância do branco}) \times 100}{\text{absorvância do controle}}$.

4.14 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi realizada com o óleo essencial bruto, obtido das folhas secas coletadas no período do verão, e com as diluições de 75 e de 50%. A metodologia aplicada foi a de difusão em ágar utilizando discos de papel de filtro (BAUER *et al.*, 1966).

As diluições foram preparadas com o emulsificador Tween 80, na concentração de 10% em solução com o óleo volátil, para que não haja interferência no resultado (NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Para a concentração de 75%, foram adicionados em um tubo estéril 2,25 ml de óleo essencial, 0,3 ml de Tween 80 e q.s.p. 3 ml de água destilada, sendo o meio líquido homogeneizado em banho-maria. Para a concentração de 50%, apenas o volume do óleo essencial foi alterado para 1,5 ml (ALLEGRIINI *et al.*, 1973).

Foram utilizadas as cepas de *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Trichosporon beigelii*, *Trichosporon asahii*, *Cryptococcus neoformans* e *Rhodotorula* sp. As doze leveduras foram obtidas no Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas (Curitiba-PR), e são comumente isoladas de pacientes, principalmente aqueles imunocomprometidos. Também foi testada a levedura *Malassezia pachydermatis*, isolada do ouvido de cães, nos quais causa otite. As cepas foram repicadas em tubos contendo Agar Potato Dextrose (APD) e mantidas em estufa a 28 °C até o seu desenvolvimento. Após, os tubos foram mantidos hermeticamente fechados e em temperatura ambiente.

A concentração dos inóculos fúngicos foi de aproximadamente $1,3 \times 10^8$ ufc/ml, determinada por meio do teste de sensibilidade utilizando a cepa de *C. albicans* como referência. O padrão de turbidez ficou próximo do tubo 0,5 da escala de McFarland. Para a diluição das colônias foi utilizada uma solução de cloreto de sódio a 0,9%. As cepas foram mantidas em APD, sendo utilizados para os testes os repiques de 48 horas em APD, incubados a 28 °C.

Em placas de petri descartáveis contendo APD, as leveduras foram semeadas superficialmente, utilizando um *swab* estéril. Discos de 10 mm de diâmetro foram dispostos na placa, nos quais foram impregnados 40 μ l do óleo essencial bruto ou de cada solução ajustada à concentração previamente estabelecida. Esse diâmetro do disco foi definido em estudos prévios, para

comportar um volume maior de amostra, evitando o extravasamento e aumentando a difusão do óleo essencial.

As placas permaneceram em repouso por 24 horas, em temperatura ambiente, para a difusão correta do óleo, sendo, então, incubadas em estufa a 28 °C por 48 horas. Após a incubação, foi mensurado, em milímetros, o diâmetro do halo de inibição e a região de inibição entre a borda do disco e o crescimento fúngico, sendo esta última medida realizada só com os discos impregnados com o óleo bruto. O ensaio foi feito em triplicata.

Como controle negativo, foram usados discos impregnados com Tween 80 a 10%. E, como controle positivo, foi empregado um antifúngico padrão, a nistatina. Foram utilizados discos de 6 mm com concentração de 100 U.I. (ou 20 µg/disco), obtidos do CECON, repetindo a mesma metodologia. Após a incubação foi mensurado o diâmetro do halo de inibição e a região de inibição entre a borda do disco e o crescimento fúngico. Esses dois tipos de medições foram realizados para desconsiderar os diâmetros diferentes dos discos de nistatina (6 mm) e daqueles incorporados com o óleo (10 mm).

Os testes estatísticos aplicados para os resultados foram ANOVA, DMS e teste T, utilizando o programa MSTATC (KOEHLER, 1996).

A ação fungicida/fungistática também foi analisada. Foi utilizado o Caldo Sabouraud Dextrose. Em tubos contendo 9 ml do meio estéril foram acrescentados, com alça de platina, amostras das leveduras desenvolvidas nas placas, para verificar a viabilidade das cepas. Em outros tubos, foram acrescentados os discos de papel de filtro impregnados com o óleo essencial bruto e que inibiram as leveduras. Os tubos foram incubados na estufa a 28 °C por 48 horas. Após esse tempo, a turbidez do meio revelou se houve ou não o crescimento dos fungos. O meio não turvo indicou a ação fungicida (morte do fungo) da essência. A verificação de turbidez demonstrou uma ação fungistática (inibição da levedura). Ainda, para a comprovação desses resultados, com um *swab* estéril, amostras do caldo com os discos foram repicadas para placas de petri contendo APD e incubadas na estufa a 28 °C por 48 horas. O crescimento das cepas confirmou a atividade fungistática e a ausência de crescimento afirmou a ação fungicida. O teste foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfoanatômica do *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata*

A análise morfológica caracterizou a folha jovem de *E. globulus* ssp. *bicostata* como ovalado-oblonga, com ápice mucronado, margem e superfície lisas, limbo íntegro, nervação peninérvia, nervura da face abaxial saliente, consistência coriácea, discolor (face adaxial verde escuro e face abaxial esbranquiçada pela presença de cera), séssil e oposta. As descrições conferem com as citadas por PENFOLD e WILLIS (1961). O comprimento foliar variou entre 7 a 14,5 cm e a largura variou entre 2 a 6,5 cm (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009). Essas características se assemelham com as das folhas jovens de *E. globulus* (JOHNSON, 1926; COSTA, 1975; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996). As folhas adultas apresentam morfologia diferente das folhas jovens e como consequência a anatomia também não é a mesma (JOHNSON, 1926; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996).

5.1.1 Lâminas semipermanentes

Estômatos se fazem presentes apenas na face abaxial, sendo a folha, portanto, hipoestomática (Figuras 7A e 7B) (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009). Esta característica confere com a descrita na literatura para eucaliptos em geral (BONA; BOEGER; SANTOS, 2004) e para folhas jovens de *E. globulus* (JOHNSON, 1926) e *E. globulus* ssp. *globulus* (JAMES; SMITH; VOGELMANN, 1999). Os estômatos são do tipo anomocítico, igualmente aos encontrados no *E. globulus* (não há menção do estágio da folha) (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991), ou seja, não apresentam células subsidiárias (Figura 7B). Esta característica é mencionada para este gênero (TUFFI SANTOS *et al.*, 2008b), mas no *E. camaldulensis*, os estômatos variam entre anomocíticos e anisocíticos (TANTAWY, 2004). Estômatos em ambas as faces da folha foram descritos no *Eucalyptus grandis* (TUFFI SANTOS *et al.*, 2008a), no *E. smithii* (FABROWSKI, 2002), nas folhas adultas de *E. globulus* ssp. *globulus* (JAMES; SMITH; VOGELMANN, 1999), no *E. globulus* (JOHNSON, 1926) e no *E. camaldulensis* (TANTAWAY, 2004).

As células epidérmicas são de formato poliédrico a levemente arredondadas (Figuras 7A e 7B).

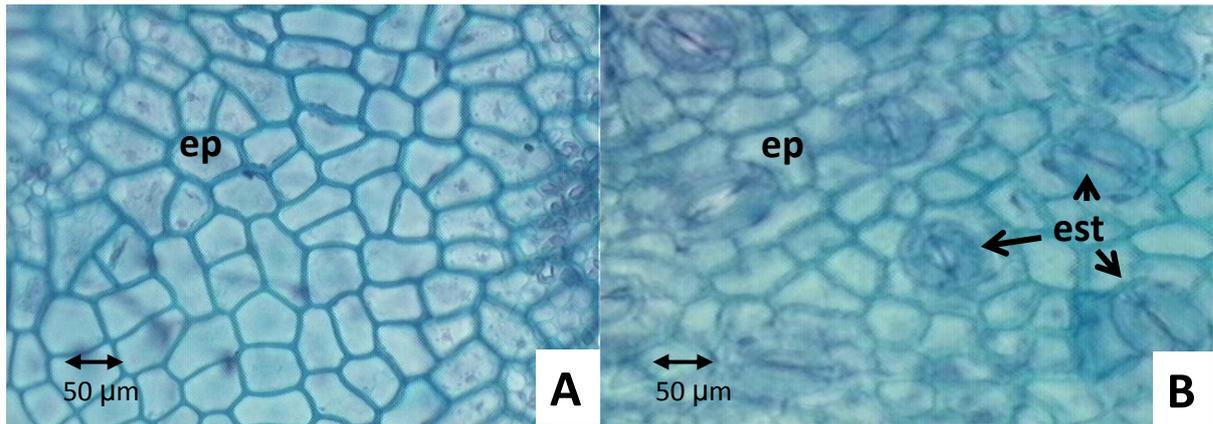


FIGURA 7 - SECÇÃO PARADÉRMICA DA FOLHA: **A**- FACE ADAXIAL. **B**- FACE ABAXIAL REVELANDO PRESENÇA DE ESTÔMATOS DO TIPO ANOMOCÍTICO. **EP**: EPIDERME, **EST**: ESTÔMATO

5.1.2 Lâminas permanentes

A epiderme é unisseriada, em ambas as faces, com a presença de cutícula nas epidermes abaxial e adaxial (Figura 8A), assim como registrado nas folhas de *E. globulus* (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996). Na face adaxial a cutícula é mais espessada. O mesofilo é heterogêneo e assimétrico com o parênquima paliçádico voltado para a face adaxial, sendo formado por duas camadas, e o lacunoso para a face abaxial (Figura 8A) (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009). Este mesmo tipo foi encontrado na maioria das espécies de eucalipto estudadas (TUFFI SANTOS *et al.*, 2008a), principalmente em folhas jovens (JOHNSON, 1926; JAMES; SMITH; VOGELMANN, 1999; TUFFI SANTOS *et al.*, 2008b). Nas folhas de *E. smithii*, nas folhas de *E. camaldulensis* e nas folhas adultas de *E. globulus ssp. globulus* e *E. globulus*, o mesofilo encontrado foi do tipo heterogêneo simétrico, ou seja, com parênquima paliçádico em ambas as faces da epiderme (JOHNSON, 1926; JAMES; SMITH; VOGELMANN, 1999; FABROWSKI, 2002; TANTAWAY, 2004).

As cavidades secretoras de óleo essencial encontram-se abaixo da epiderme nas duas faces da folha e ao longo de todo o mesofilo (Figura 8B) (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009). COSTA (1975) e a FARMACOPÉIA Brasileira (1996) caracterizam as bolsas secretoras de origem esquizógena, para *E. globulus*.

No mesofilo, foram observados idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio em formato de drusas, agrupados ou solitários (Figura 8B), muito comum em

representantes da família Myrtaceae (METCALFE; CHALK, 1965; COSTA, 1975; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996).

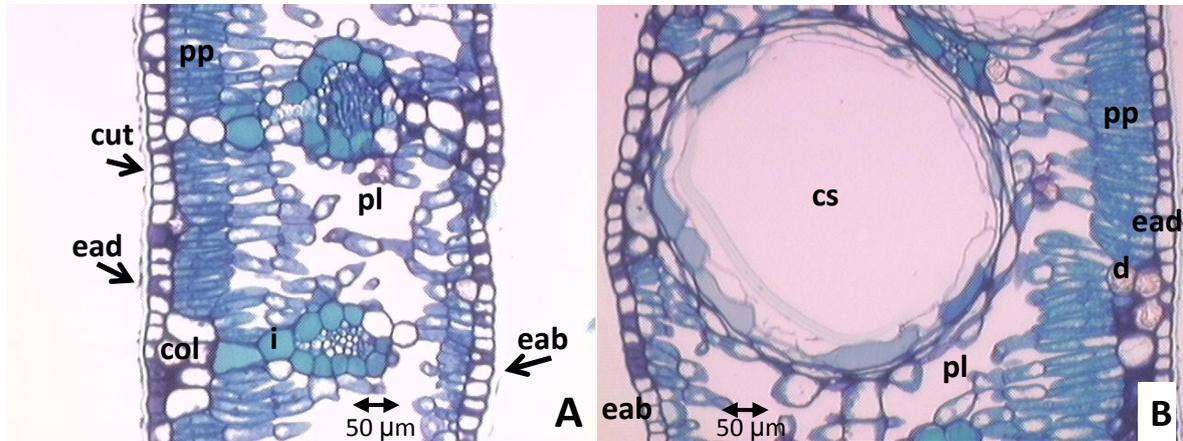


FIGURA 8 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA LÂMINA FOLIAR: **A**- EPIDERME UNISTRATIFICADA, DETALHE DA CUTÍCULA ESPESSE E MESOFILO DORSIVENTRAL. **B**- DETALHE DA CAVIDADE SECRETORA DE ÓLEO ESSENCIAL. **EAD**: EPIDERME ADAXIAL, **EAB**: EPIDERME ABAXIAL, **CUT**: CUTÍCULA, **PP**: PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, **PL**: PARÊNQUIMA LACUNOSO, **COL**: COLÊNQUIMA, **I**: IDIOBLASTO, **CS**: CAVIDADE SECRETORA, **D**: IDIOBLASTO COM DRUSA

Os feixes vasculares do limbo, em sua maioria, são bicolaterais, mas o floema adaxial nem sempre está claramente evidenciado (Figura 9A) (METCALFE; CHALK, 1965). Os feixes de menor porte tendem a ser colaterais (Figura 9B).

Ao redor dos feixes, formando uma bainha parenquimática, ocorrem idioblastos contendo compostos fenólicos (Figuras 9A e 9B), em especial, taninos, segundo dados da literatura (METCALFE; CHALK, 1965; TUFFI SANTOS *et al.* 2008b). A presença de fenólicos também foi citada para o *E. smithii* (FABROWSKI, 2002). Esses componentes, além de serem frequentes em todo mesofilo, são mais abundantes no parênquima, envolvendo os feixes vasculares, e no floema (BONA; BOEGER; SANTOS, 2004).

Também foram observadas células colenquimáticas subepidérmicas nos feixes vasculares, e também, em alguns feixes, células esclerenquimáticas (Figuras 9A e 9B), o que confere com dados da literatura para *E. globulus* (COSTA, 1975; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

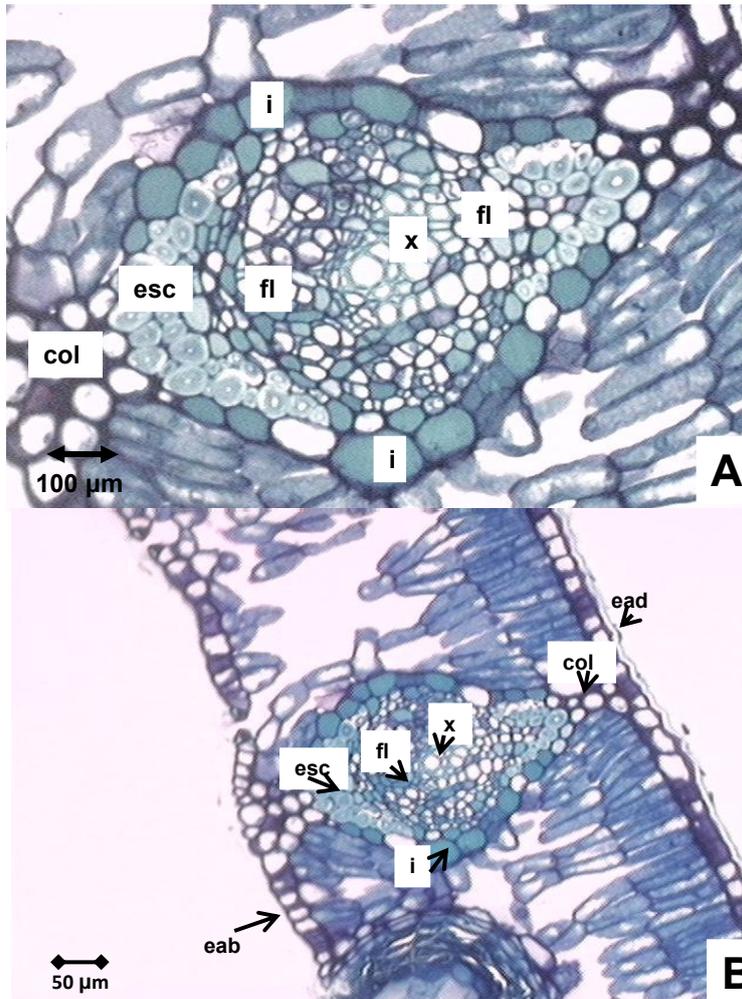


FIGURA 9 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA LÂMINA FOLIAR: **A-** DETALHE DE UM FEIXE VASCULAR DE MÉDIO PORTE COM ORGANIZAÇÃO BICOLATERAL. **B-** DETALHE DE UM FEIXE VASCULAR DE PEQUENO PORTE COLATERAL. **EAD:** EPIDERME ADAXIAL, **EAB:** EPIDERME ABAXIAL, **COL:** COLÊNQUIMA, **ESC:** ESCLERÊNQUIMA, **FL:** FLOEMA, **X:** XILEMA, **I:** IDIOBLASTO

A nervura central é composta por um feixe vascular de maior porte voltado para a face abaxial e por dois feixes de menor porte voltados para a face adaxial (Figuras 10A e 10B) (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009). Mesma organização é citada na literatura para eucaliptos em geral (BONA; BOEGER; SANTOS, 2004). Na nervura mediana encontram-se células colenquimáticas subepidérmicas (Figura 10A), também presentes em *E. globulus* (COSTA, 1975; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1996).

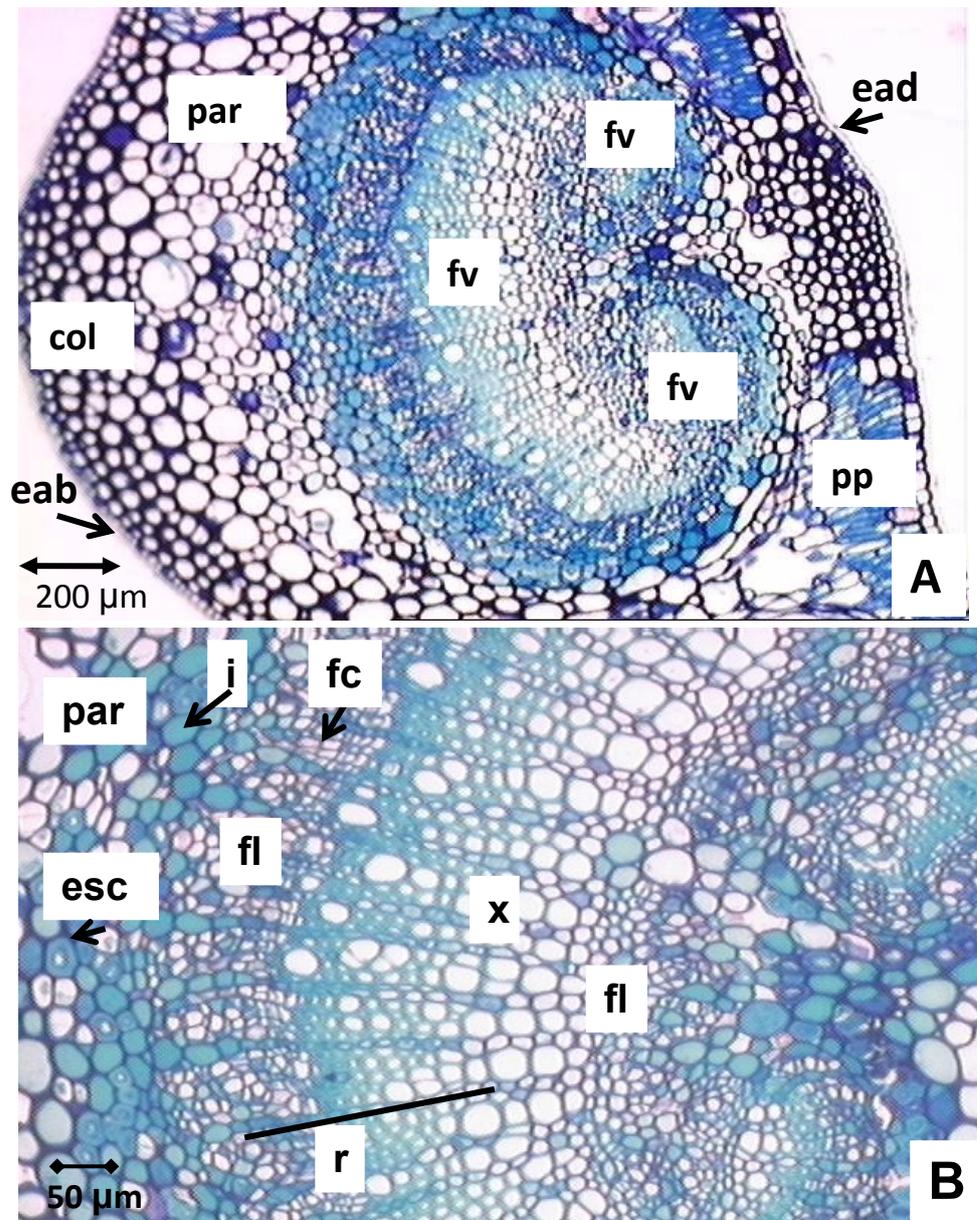


FIGURA 10 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL DA FOLHA: **A**- DETALHE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FEIXES, 1 FEIXE DE MAIOR PORTE VOLTADO PARA A FACE ABAXIAL E 2 FEIXES DE MENOR PORTE VOLTADO PARA A FACE ADAXIAL; CÉLULAS COLENQUIMÁTICAS SUBEPIDÉRMICAS; PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL. **B**- DETALHE DO FEIXE DE MAIOR PORTE DE ORGANIZAÇÃO BICOLATERAL. **EAD**: EPIDERME ADAXIAL, **EAB**: EPIDERME ABAXIAL, **COL**: COLÊNQUIMA, **PAR**: PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, **PP**: PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, **FV**: FEIXE VASCULAR, **ESC**: ESCLERÊNQUIMA, **FL**: FLOEMA SECUNDÁRIO, **X**: XILEMA SECUNDÁRIO, **I**: IDIOBLASTO, **FC**: FAIXA CAMBIAL, **R**: RAIOS PARENQUIMÁTICOS

5.1.3 Análise ultra-estrutural

Na análise ultra-estrutural foi evidenciada a organização da cera epicuticular. Esta cera pode apresentar diferentes formas. Em algumas espécies ela é lisa e em outras é coberta por partículas chamadas de cristalóides (ENSİKAT *et al.*, 2006).

Em espécies de eucaliptos são comuns ceras do tipo cristalóide (BARTHLOTT *et al.*, 1998).

Na subespécie em questão foram observadas diferenças entre as ceras da face abaxial e adaxial. Na face adaxial foi observada cera epicuticular cristalóide do tipo filamentosa (Figura 11A), que são longos e finos cristalóides. Na face abaxial ocorre cera cristalóide do tipo túbulo (Figura 11B), cuja característica é o aspecto cilíndrico com a extremidade aberta (MALINOWSKI; NAKASHIMA; ALQUINI, 2009). Para o *E. globulus*, segundo a composição química, o túbulo é classificado como diacetona, cujo principal constituinte são as β -dicetonas (C33) (HORN; KRANZ; LAMBERTON, 1964; BARTHLOTT *et al.*, 1998; ENSIKAT *et al.*, 2006). Como a subespécie *bicostata* trata-se de uma derivação do *E. globulus*, supõe-se que a origem química seja a mesma, mas testes químicos não foram realizados para a comprovação.

As folhas jovens apresentam mais cera epicuticular do que as folhas adultas, e a concentração desta cera é maior na face abaxial, assim como foi constatado no *E. globulus* ssp. *pseudoglobulus* (STEINBAUER; SCHIESTL; DAVIES, 2004).

Para certos insetos, a presença de cera é um indicador do local correto para a deposição dos ovos. Como as folhas jovens apresentam menor peso específico, elas são ingeridas mais facilmente, então representantes de mariposas reconhecem essas folhas pela presença expressiva de cera na face abaxial e então depositam os ovos (STEINBAUER; SCHIESTL; DAVIES, 2004).

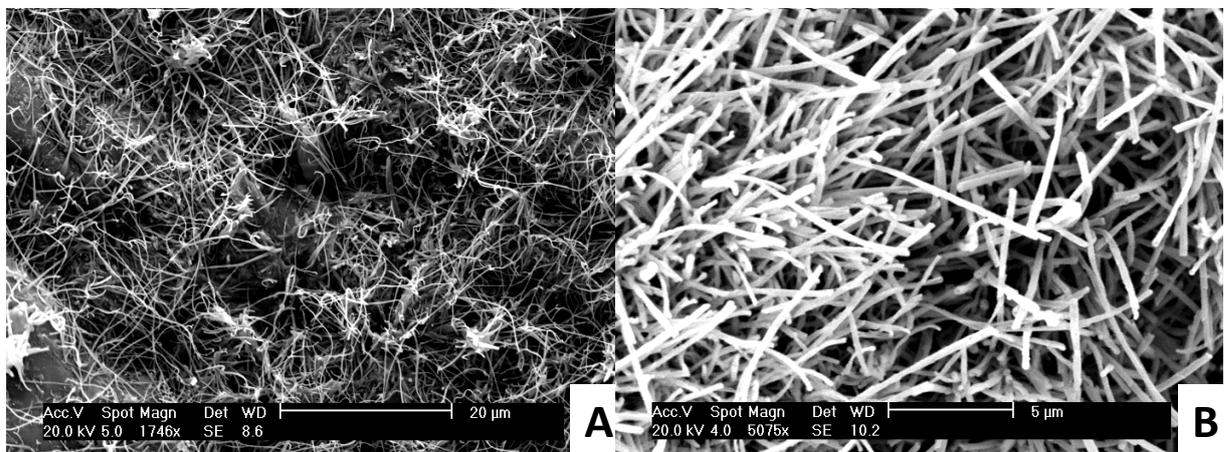


FIGURA 11 – FACES DA FOLHA POR MEV: **A**- DETALHE DA FACE ADAXIAL COM PRESENÇA DE CERA EPICUTICULAR EM FORMA DE FILAMENTO. **B**- DETALHE DA FACE ABAXIAL COM PRESENÇA DE CERA EPICUTICULAR EM FORMA DE TÚBULO

5.2 Teor de umidade

O teor de umidade encontrado nas folhas secas utilizadas para a extração do óleo essencial foi de $7,8 \pm 0,413\%$, valor este aproximado para as quatro coletas sazonais. Esta porcentagem encontrada está entre o teor máximo estabelecido nas diferentes farmacopéias (entre 8% e 14%) (FARIAS, 2007).

5.3 Ensaio fitoquímico

No Quadro 3 estão apresentados os resultados encontrados para as pesquisas de metabólitos secundários realizadas com as frações do extrato hidroalcoólico a 20%, bem como as características organolépticas e o teor de resíduo sólido.

QUADRO 3 – PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20% E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20%	RESULTADOS				
	F1	F2	F3	F4	F5
Metabólitos secundários					
Glicosídeos flavônicos					
- Reação de Shinoda	---	---	---	+	+
- Reação de Zinco	---	---	+	+	+
- Reação Oxalo-bórica	+	+	+	+	+
- Reação de Pacheco	+	+	+	+	+
Esteróides e/ou Triterpenóides					
- Reação de Xantidrol	---	---	---	---	X
- Reação de Baljet	---	---	---	+	X
- Reação de Kedde	---	---	---	---	X
- Reação de Keller-Killiani	+	+	+	---	X
- Reação de Legal	---	---	---	---	X
- Reação de Tollens	+	+	+	+	X
Leucoantocianidinas	---	---	---	---	---
Alcalóides	---	---	---	---	---
Glicosídeos antraquinônicos	---	---	+	+	---
Cumarinas	---	---	---	---	X
Taninos	X	X	X	X	+
Glicosídeos saponínicos	X	X	X	+	+
Glicosídeos antociânicos	X	X	X	+	+
Aminoácidos	+	+	+	+	+
Características organolépticas					
Cor	Verde escuro				
Odor	Aromático, característico de eucalipto				
Sabor	Picante e refrescante				
pH	5,0 a 6,0				
Teor de resíduo sólido	18,685g%				

---: negativo; +: positivo; x: a pesquisa não foi realizada

Os grupos encontrados nas frações do extrato hidroalcoólico a 20% foram os glicosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenóides, glicosídeos antraquinônicos, taninos, glicosídeos saponínicos, glicosídeos antociânicos e aminoácidos. A ausência de alcalóides é comum a partir da Ordem Myrtales, da qual pertence esta subespécie (CRONQUIST, 1981). A presença de glicosídeos flavônicos foi constatada em várias espécies de eucaliptos (EGWAIKHIDE *et al.*, 2009; FRANCO, 2005; FABROWSKI, 2002; COSTA, 1975). Os esteróides e triterpenóides e os

glicosídeos saponínicos também foram encontrados em espécies de *E. cinerea* (FRANCO, 2005) e *E. smithii* (FABROWSKI, 2002).

O extrato do *E. globulus* ssp. *bicostata* pode apresentar valor comercial devido aos seus metabólitos encontrados. Os glicosídeos saponínicos e os glicosídeos flavônicos são altamente empregados em preparações farmacêuticas e industriais, como na indústria de alimentos e de curtimento de couros (COSTA, 1975).

Os resultados referentes aos ensaios efetuados com o extrato aquoso a 20% encontram-se no Quadro 4.

QUADRO 4 – PESQUISA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO EXTRATO AQUOSO A 20% E CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

EXTRATO AQUOSO A 20%	RESULTADOS
Metabólitos secundários	
Taninos	
Reagentes:	
Cloreto férrico 1%	+
Sulfato de ferro amoniacal 5%	+
Cloridrato de emetina	+
Gelatina 5%	+
Cianeto de potássio	---
Ácido nitroso	+
Dicromato de potássio	---
Formol-clorídrico	+
Ácidos fixos	+
Aminogrupos	+
Glicosídeos cianogênicos	---
Características organolépticas	
Cor	Castanho-avermelhado
Odor	Aromático, característico de eucalipto
Sabor	Picante e levemente adocicado
pH	4,0
Teor de resíduo sólido	10,425g%

---: negativo; +: positivo

No extrato aquoso a 20% foram encontrados taninos, ácidos fixos e aminogrupos. Os taninos condensados e hidrolisáveis foram amplamente relatados em eucaliptos (EGWAIKHIDE *et al.*, 2009; FRANCO, 2005; FABROWSKI, 2002;

COSTA, 1975). Os ácidos fixos e os aminogrupos também foram registrados em *E. cinerea* (FRANCO, 2005).

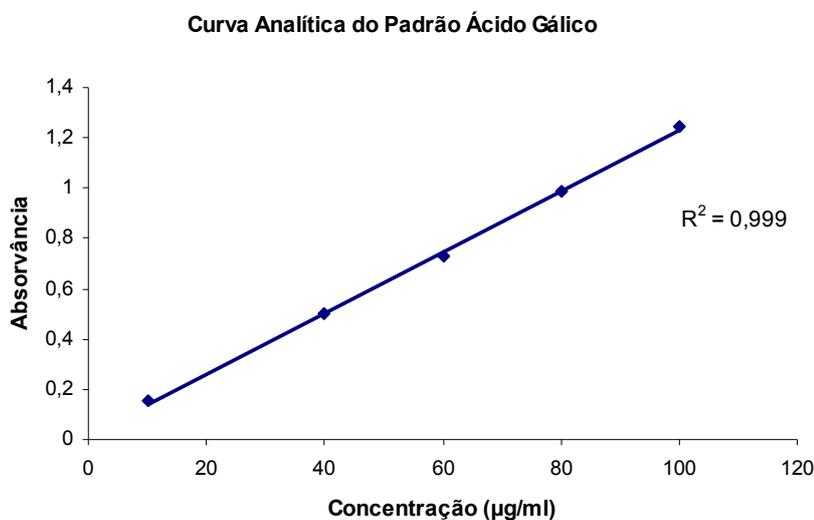
Um estudo demonstrou que quanto maior a disponibilidade de nitrogênio no solo mais metabólitos nitrogenados, como alcalóides e glicosídeos cianogênicos, eram produzidos pelo vegetal. Ao contrário dos compostos fenólicos, como os taninos e os flavonóides, que seriam sintetizados em menor quantidade em abundância deste nutriente (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Na pesquisa com o *E. globulus* ssp. *bicostata* foram encontrados substâncias fenólicas, e alcalóides e glicosídeos cianogênicos foram ausentes. Este resultado pode ter relação com as condições do solo onde a árvore se encontra, ou seja, é possível que haja pouca disponibilidade de nitrogênio. Mas para confirmação desta hipótese são necessários estudos da composição do solo.

5.4 Determinação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos compreendem os fenóis simples, os ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), as cumarinas, os flavonóides (flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis e antocianidinas), os estilbenos, os taninos condensados e hidrolisáveis, as lignanas e as ligninas, e muitos deles apresentam atividades biológicas (SOUSA *et al.*, 2007).

A equação da reta, obtida da curva analítica do padrão ácido gálico (Gráfico 1), permitiu o cálculo do teor de fenóis totais, expresso em mg em equivalentes de ácido gálico/g de amostra.

GRÁFICO 1 – CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO GÁLICO



O resultado encontrado para fenóis totais foi de $118,35 \pm 8,65$ mg em equivalentes de ácido gálico/g de amostra.

ALMEIDA *et al.* (2009) encontraram 311 ± 20 mg de fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico/g de amostra, para o extrato aquoso das folhas de *Eucalyptus globulus*. Os autores identificaram quatro compostos: os ácidos fenólicos clorogênico e elágico e os polifenóis flavônicos rutina e quercitina. Estas substâncias apresentam elevada atividade biológica. Um extrato comercial de folhas de eucalipto utilizado como aditivo em alimentos apresentou, na dosagem de polifenóis, o total de 11,9 mg/g em equivalentes de ácido gálico, este resultado coincidiu com o peso (12,1 mg/g) dos oito compostos isolados (ácidos elágico e gálico, eucaliptona e macrocarpal A, B, C, D e E) (AMAKURA *et al.*, 2002).

Entretanto, o extrato acetato de etila das cascas do *E. globulus* não apresentou elevada concentração de fenóis, 10,4 mg em equivalentes de ácido gálico/g de amostra (CRUZ; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2005). O extrato metanólico da madeira da mesma espécie também não demonstrou uma determinação alta, variou entre 2,95 mg/g e 15,9 mg/g, em equivalentes de ácido gálico (VÁZQUEZ *et al.*, 2008).

As diferenças de valores encontrados com os dados da literatura podem ter relação com diversos fatores, como o próprio fato do *E. globulus* ssp. *bicostata* apresentar características diferentes da espécie da qual deriva, os métodos de extração, condições e época da coleta das folhas, técnica de armazenamento,

condições do solo, entre outros. Por isso existem dificuldades em relacionar diretamente um estudo com o outro.

GOBBO-NETO e LOPES (2007) demonstraram que tecidos mais novos normalmente apresentam maior taxa biossintética de metabólitos secundários, como na síntese de ácidos fenólicos e flavonóides. Cabe-se lembrar que este estudo foi realizado com as folhas jovens do eucalipto.

O resultado obtido para fenólicos totais, neste trabalho, indicou que há uma quantidade considerável desses compostos nas folhas, e incentivou o estudo da atividade biológica do extrato da subespécie.

5.5 Óleo essencial das folhas de *E. globulus* ssp. *bicostata*

5.5.1 Rendimento

A partir dos resultados obtidos, foi observado que o melhor rendimento do óleo foi com a extração de folhas secas, uma vez que há pouca quantidade de água em comparação com as folhas frescas. Outra razão para esta diferença é a presença de cera epicuticular nas folhas frescas, já que esta película pode causar uma incompleta hidrodifusão do óleo presente nas glândulas (BABU; SINGH, 2009). Para avaliar no grupo das folhas secas e no grupo das folhas frescas qual foi o melhor rendimento frente à sazonalidade, foi realizado o teste estatístico ANOVA, seguido do DMS (Tabela 1).

TABELA 1 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata*

AMOSTRAS	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL (ML/100 G)	
	FOLHAS SECAS ⁽¹⁾	FOLHAS FRESCAS ⁽²⁾
PRIMAVERA	5,4 ± 0,00% ^a	2,8 ± 0,4243% ^a
VERÃO	5,7 ± 0,2828% ^a	2,5 ± 0,00% ^a
OUTONO	5,75 ± 0,0707% ^a	5 ± 0,1414% ^b
INVERNO	5,05 ± 0,0707% ^a	2,85 ± 0,9192% ^a

⁽¹⁾ Médias acompanhadas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de DMS ($p \geq 0,01$).

⁽²⁾ Médias acompanhadas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de DMS ($p \geq 0,01$).

O melhor rendimento foi encontrado nas folhas secas das estações outono e verão. Comparando-se as épocas de verão e outono, PENFOLD e WILLIS (1961) verificaram que espécies de eucalipto tendem a apresentar maior concentração de óleo essencial no verão. O óleo essencial das folhas frescas de *E. globulus* apresentou a sua maior concentração no verão (1,29%), seguido do inverno (1,16%), outono (1,06%) e primavera (0,77%) (SILVA; BRITO; JUNIOR, 2006). No *E. smithii*, os melhores rendimentos foram constatados na primavera e no inverno (FABROWSKI, 2002), o oposto do resultado verificado para a subespécie *bicostata*. A sazonalidade foi fator de interferência nas emissões de monoterpenos das folhas de *E. globulus*, sendo que a concentração máxima emitida foi no mês de janeiro (verão) e a mínima no mês de julho (inverno). Essas disparidades de rendimento frente à sazonalidade são observadas por se tratarem de espécies e subespécies diferentes de eucalipto.

O complexo fenômeno de variação sazonal na concentração dos óleos nas folhas poderia ser explicado ao menos em termos de balanço dinâmico pela síntese de terpenos, como o aumento das concentrações e suas alterações e utilizações pela planta, sendo relacionado com a atividade metabólica do eucalipto (BOLAND; BROPHY; HOUSE, 1991¹¹ apud VITTI; BRITO, 2003).

Em relação às folhas secas, foi observado que nos meses de janeiro a maio (verão e outono) houve um ligeiro aumento do rendimento. No mês de junho (inverno) houve um decréscimo do rendimento, o menor de todos, e no mês de setembro (primavera) o rendimento aumentou. Portanto, as principais alterações observadas foram do outono para o inverno (decréscimo do rendimento) e do inverno para a primavera (aumento do rendimento), demonstrando que a estação mais fria correspondeu a uma faixa de transição na concentração da essência. HERNÁNDEZ *et al.* (1988) também obtiveram um ligeiro aumento do rendimento do óleo, extraído da mesma subespécie desta pesquisa, nos meses de janeiro a maio. Mas apesar dessas oscilações do rendimento do óleo essencial ao longo do ano, estatisticamente não houve diferenças entre os resultados. A constância dos valores pode ter relação com as temperaturas, pois os valores destas, nos dias das coletas, não estavam muito diferentes entre si (Quadro 2). Entretanto, o rendimento obtido

¹¹ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

das folhas frescas da coleta de outono, de 5%, foi significativamente diferente dos outros valores para folhas frescas. Este resultado pode ter relação com o metabolismo do vegetal ou com alguma variável ambiental, mas o motivo deste rendimento ter sido próximo ao das folhas secas não foi investigado.

Durante as 6 horas de extração observou-se que foi na primeira hora que se obteve o maior rendimento, nas horas seguintes o volume de óleo essencial obtido foi consideravelmente menor. Este fato está de acordo com os encontrados por VITURRO, MOLINA e HEIT (2003) e HERNÁNDEZ *et al.* (1988). FRANCO (2005) e FABROWSKI (2002) obtiveram na primeira hora 80% e 81%, respectivamente, do volume total de óleo extraído.

Traçando-se um paralelo entre os rendimentos das folhas secas e frescas, notou-se que enquanto nas folhas secas o menor rendimento foi no inverno, nas frescas foi no verão. Em ordem crescente de rendimento, nas duas amostras das folhas a primavera está localizada na segunda posição e o outono foi a estação que forneceu o melhor rendimento. A diferença de rendimento entre o inverno e o verão nas folhas secas e frescas pode ter relação com o processo de secagem, ou seja, na coleta de inverno, nas folhas secas, pode ter havido maior volatilização do óleo essencial.

O rendimento encontrado, tanto para folhas secas quanto para folhas frescas, foi comparado com outros dados da literatura para o *E. globulus* ssp. *bicostata*. Em um estudo realizado na Índia, DAYAL e AYYAR (1986) obtiveram um rendimento de 6,58% para as folhas secas. Em Cuba, o maior rendimento encontrado por HERNÁNDEZ *et al.* (1988) foi de 1,4% para folhas frescas. VITURRO, MOLINA e HEIT (2003) também estudaram folhas jovens e frescas, obtendo o rendimento de 3,9% em 2 horas de extração. Em um estudo realizado no Uruguai, onde as subespécies de *E. globulus* são amplamente cultivadas, o *E. globulus* ssp. *bicostata* apresentou rendimento de folhas frescas de 0,88%, e os melhores resultados foram obtidos nas estações frias, entre os meses de maio e setembro (MANTERO *et al.*, 2007). Segundo BOLAND, BROPHY e HOUSE ¹² apud VITTI e BRITO (2003), o rendimento do óleo foliar do *E. globulus* ssp. *bicostata* varia de 1,7 a 2%. Comparando-se os resultados com o *E. globulus*, espécie da qual a subespécie

¹² BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

bicostata deriva, esta apresentou rendimento consideravelmente superior. Quanto às folhas frescas de *E. globulus*, CIMANGA *et al.* (2002) obtiveram um rendimento de 1,87%. Em relação às folhas secas, BARTON, TJANDRA e NICHOLAS (1989) obtiveram um rendimento entre 1 e 2%. A essência das folhas frescas de outra subespécie de *E. globulus*, a ssp. *globulus*, rendeu entre 1,3 e 2,7% (SILVESTRE *et al.*, 1997). De acordo com estes estudos é possível indicar que as subespécies, deste eucalipto especificamente, apresentam maior rendimento de óleo essencial.

Outras espécies de eucalipto também apresentaram bons resultados quanto ao rendimento. ESTANISLAU *et al.* (2001) verificaram um rendimento alto, de 4%, para as folhas secas de *Eucalyptus citriodora*, assim como SILOU *et al.* (2009) que encontraram para folhas secas jovens e adultas da mesma espécie um rendimento de 6,1 a 6,9%. FRANCO *et al.* (2005) obtiveram um rendimento de 6,07% de óleo essencial das folhas secas de *E. cinerea*.

BOLAND, BROPHY e HOUSE ¹³ apud HE, MURRAY e LYONS (2000) afirmaram que as variações do rendimento das essências nas folhas de eucaliptos são atribuídas a três fatores principais: genética, tipo e idade da folha, e ambiente. Este último fator pode ter tanto relação com a temperatura, de acordo com a época do ano, como também com a composição do solo e seus nutrientes. CIMANGA *et al.* (2002) também atribuíram as diferenças de rendimento, encontradas para a mesma espécie ou subespécie, ao clima, ao solo, à idade da árvore, ao horário de coleta e ao modo de extração.

HE, MURRAY e LYONS (2000) estudaram a variação sazonal de emissão de monoterpenos das folhas de *Eucalyptus globulus*. As árvores jovens (um ano de idade) emitiram sete vezes mais monoterpenos do que as árvores com sete anos de idade. Relacionando essa informação com os dados obtidos, pode-se sugerir que folhas jovens apresentam maior rendimento do óleo do que folhas adultas, já que o resultado encontrado para as folhas jovens secas foi acima de 5% e para as folhas frescas superior a 2,5%. SILVESTRE *et al.* (1997) verificaram, em *E. globulus*, que folhas jovens tendem a possuir maior rendimento do que folhas mais velhas. GOBBO-NETO e LOPES (2007) também concluíram que tecidos mais novos devem apresentar maior quantidade de óleos essenciais.

¹³ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

Os elevados rendimentos das folhas secas do *E. globulus* ssp. *bicostata* e a constância entre os resultados durante as estações do ano são requisitos importantes a serem considerados na exploração deste óleo essencial para uso comercial, pois a falta de interferência significativa da sazonalidade na quantidade de essência extraída torna possível a coleta das folhas em qualquer período do ano.

5.5.2 Análises físico-químicas

Os resultados das análises de densidade relativa e do índice de refração estão apresentados na Tabela 2. Os valores correspondem às médias obtidas de repetições em triplicata acompanhadas do desvio padrão.

TABELA 2 – DENSIDADE RELATIVA E ÍNDICE DE REFRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

AMOSTRAS	DENSIDADE RELATIVA		ÍNDICE DE REFRAÇÃO	
	FOLHAS SECAS	FOLHAS FRESCAS	FOLHAS SECAS	FOLHAS FRESCAS
PRIMAVERA	0,913 ±0,00	0,9137 ±0,0002	1,4621 ± 0,00011	1,4622 ±0,00
VERÃO	0,9164 ±0,00015	0,9114 ±0,00015	1,4623 ± 0,00015	1,4609 ± 0,00011
OUTONO	0,9164 ±0,00028	0,9183 ±0,00019	1,4601 ± 0,00011	1,4601 ± 0,00011
INVERNO	0,9165 ± 0,00015	0,9165 ±0,00013	1,46 ±0,00	1,46 ±0,00

Nos dados da tabela foi verificada a densidade entre 0,9114 e 0,9183, estando estes números dentro dos valores para óleos essenciais medicinais (0,91-0,93) (GUENTHER, 1961). HERNÁNDEZ *et al.* (1988) observaram valores entre 0,918 e 0,927 para esta mesma subespécie, e COSTA (1972) apontou valores entre 0,910 e 0,925 para óleos de eucalipto. Os resultados também foram parecidos com os definidos para o *E. globulus*, com densidade entre 0,904 e 0,924 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Segundo a *International Standard Organization* (ISO) a densidade relativa para os óleos de eucalipto ricos em eucaliptol deve estar entre 0,906 e 0,925 (ISO 770–1980) ou entre 0,918 e 0,928

(ISO 3065–1974) (BOLAND; BROPHY; HOUSE, 1991¹⁴ apud VITTI; BRITO, 2003). A variação da densidade relativa encontrada está dentro dessa faixa.

Para se determinar o índice de refração foi utilizado o refratômetro ABBE da marca alemã ausJENA. A leitura foi feita sob temperatura em torno de 24 °C. Todos os valores encontrados foram muito próximos entre si (1,46), variando apenas na terceira casa decimal, e estão dentro dos valores indicados para óleos essenciais medicinais (1,46-1,47) (GUENTHER, 1961). Também se aproximaram muito do resultado revelado por HERNÁNDEZ *et al.* (1988), entre 1,4662-1,4664, e por GUENTHER (1961), entre 1,4657-1,4804, para o *E. globulus* ssp. *bicostata*. DAYAL e AYYAR (1985) apresentaram um valor distinto dos citados para esta subespécie, 1,4549. COSTA (1972) citou valores entre 1,459 a 1,467. Os valores determinados para *Eucalyptus globulus* estão entre 1,458 e 1,47 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). A ISO 770 (1980) definiu o valor entre 1,4590-1,4670 e a ISO 3065 (1974) entre 1,4580-1,4650 para óleos com composição majoritária de 1,8-cineol (BOLAND; BROPHY; HOUSE, 1991¹⁵ apud VITTI; BRITO, 2003), correspondendo ao índice de refração encontrado.

Na Tabela 3, encontram-se os dados referentes à solubilidade do óleo em diversas concentrações de etanol.

TABELA 3 – SOLUBILIDADE* EM ETANOL DO ÓLEO ESSENCIAL

AMOSTRAS	ETANOL 70% (ml)		ETANOL 80% (ml)	
	FOLHAS SECAS	FOLHAS FRESCAS	FOLHAS SECAS	FOLHAS FRESCAS
PRIMAVERA	1,75 ± 0,3535	1,7 ± 0,5657	0,15 ± 0,0707	0,15 ± 0,0707
VERÃO	2,15 ± 0,2121	1,7 ± 0,2828	0,32 ± 0,2475	0,1 ± 0,00
OUTONO	1,25 ± 0,3535	1,4 ± 0,1414	0,2 ± 0,0707	0,25 ± 0,0707
INVERNO	0,5 ± 0,1414	0,95 ± 0,3535	0,25 ± 0,0707	0,25 ± 0,0707

NOTA: * Solubilidade: volume de etanol para solubilizar 0,1 ml de óleo essencial (v/v).

¹⁴ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

¹⁵ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

Para a concentração 90% e etanol absoluto, todas as amostras do óleo foram miscíveis em qualquer proporção. Os valores de solubilidade encontrados para o álcool 80% ficaram acima da proporção 1:1. O óleo das folhas secas do verão foi o que mais precisou de volume para solubilizar, e a amostra das folhas frescas do verão foi a que menos utilizou volume de etanol 80%, sendo a única na proporção 1:1. As outras amostras variaram pouco ou foram iguais entre si, comparando as folhas secas e frescas da mesma estação. No etanol 70%, o maior volume necessário para solubilização também foi o do óleo das folhas secas do verão, e a que menos necessitou de álcool foi a essência das folhas secas do inverno. As amostras do inverno foram as mais solúveis nesta concentração de etanol, e as menos solúveis foram as do verão. Segundo GUENTHER (1961), para o *E. globulus* ssp. *bicostata*, a solubilidade para o etanol 70% varia de 1,1 a 1,5 vol., e para os óleos essenciais medicinais a margem permanece entre 2,2-11 vol. 70%. Segundo a FARMACOPÉIA Brasileira (1988), para o *Eucalyptus globulus*, o óleo deve ser miscível em qualquer proporção com álcool absoluto e com três partes de álcool a 70%. Segundo a ISO 770 (1980) e a ISO 3065 (1974), a solubilidade em etanol 70% é de 1 vol. em 5 vols. e 1 vol. em 3 vols., respectivamente, para óleos com elevada concentração de 1,8-cineol (BOLAND, BROPHY e HOUSE, 1991¹⁶ apud VITTI e BRITO, 2003).

5.5.3 Composição química

A cromatografia em camada delgada (CCD) do óleo essencial bruto foi realizada para verificar qualitativamente a presença do componente majoritário 1,8-cineol, utilizando o padrão 1,8-cineol como referência.

Após a revelação da cromatoplaça com vanilina sulfúrica, o resultado encontrado de 0,85 para o R_f (referência), tanto na amostra quanto no padrão-referência, foi o mesmo preconizado pela FARMACOPÉIA Brasileira (1996) para o eucaliptol (Figura 12). Além desse componente foram revelados outros pontos na

¹⁶ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

cromatoplaça, estes não foram identificados por CCD, mas por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa (CG/EM).

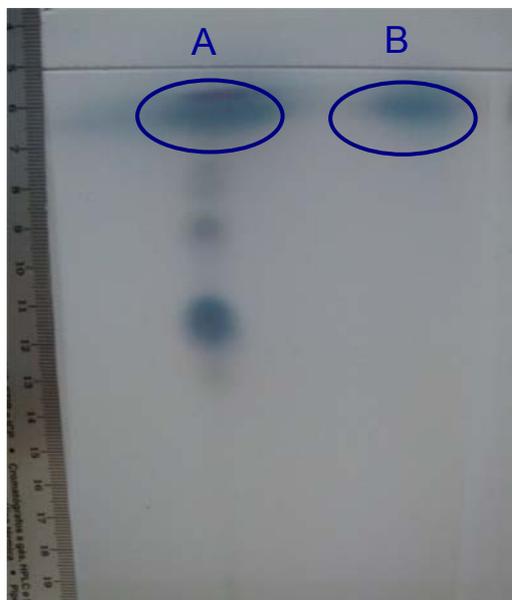


FIGURA 12 – CROMATOPLACA, EVIDENCIANDO A REVELAÇÃO DO 1,8-CINEOL NA AMOSTRA (A) E NO PADRÃO (B)

Os resultados das análises da cromatografia gasosa acoplada a detector de massa dos óleos das folhas frescas e secas podem ser observados nas tabelas 4 e 5. Esta análise foi importante para detectar os principais compostos da essência, e para verificar se durante o processo de secagem das folhas houve perda significativa, por volatilização, da concentração de substâncias relevantes. Os compostos identificados serão confirmados e os não identificados serão investigados por meio de uma nova CG/EM. Os cromatogramas e os espectros de massa estão localizados no Anexo.

Os principais compostos revelados no óleo essencial das folhas frescas foram o isovaleraldeído, o monoterpeneo 1,8-cineol, o acetato de α -terpineol e os sesquiterpenos cariofileno e *trans*-nerolidol, sendo que este foi verificado apenas no óleo do inverno. Outro componente, provável monoterpeneo, foi revelado com elevada porcentagem, mas não foi possível identificá-lo pelo espectro de massas (Tabela 4).

No óleo das folhas secas foram identificadas as mesmas substâncias, e ainda os monoterpeneos α -terpineol no óleo de outono e o *cis*-geraniol no óleo do inverno. O sesquiterpeneo α -bisaboleno foi identificado no óleo de outono e, assim como nas

folhas frescas, o *trans*-nerolidol esteve presente apenas no óleo do inverno (Tabela 5).

O monoterpeneo 1,8-cineol foi o composto majoritário em todas as amostras analisadas do óleo essencial, como já era previsto, sendo que nas folhas frescas a sua concentração variou entre 54,42 e 60,35%, e nas folhas secas variou entre 52,29 e 65,34%. O sesquiterpeneo mais abundante foi o cariofileno, a sua concentração permaneceu entre 3,39 a 7,92% nas folhas frescas e entre 5,26 a 6,85% nas folhas secas.

TABELA 4 - CG/EM DAS AMOSTRAS DO ÓLEO DE FOLHAS FRESCAS DE *E. globulus* ssp. *bicostata*

COMPOSTO	PRIMAVERA		VERÃO		OUTONO		INVERNO	
	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%
Isovaleraldeído	9,350	1,19	9,358	1,29	9,358	2,02	9,325	1,37
Não identificado	16,958	16,95	16,958	16,90	16,950	16,24	16,917	15,13
1,8-cineol	19,775	54,42	19,775	60,35	19,775	59,36	19,733	58,20
Acetato α -terpineol	25,433	19,52	25,425	18,06	25,417	18,74	25,375	18,13
Cariofileno	36,383	7,92	36,358	3,39	36,358	3,64	36,300	3,95
<i>Trans</i> -nerolidol	***	***	***	***	***	***	39,508	3,22

*** Composto ausente na amostra.
TR: tempo de retenção em minutos.

TABELA 5 - CG/EM DAS AMOSTRAS DO ÓLEO DE FOLHAS SECAS DE *E. globulus* ssp. *bicostata*

COMPOSTO	PRIMAVERA		VERÃO		OUTONO		INVERNO	
	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%
Acetona	***	***	6,925	1,36	***	***	***	***
Isovaleraldeído	9,367	1,72	9,342	2,37	9,358	1,89	9,350	1,62
Não identificado	16,967	17,39	16,950	16,76	16,958	14,37	16,942	15,80
1,8-cineol	19,783	54,31	19,767	54,35	19,800	65,34	19,758	52,29
α -terpineol	***	***	***	***	25,40	15,96	***	***
Não identificado	***	***	***	***	***	***	25,417	18,58
Acetato α -terpineol	25,433	19,73	25,425	19,60	***	***	***	***
<i>Cis</i> -geraniol	***	***	***	***	***	***	26,925	2,17
Cariofileno	36,400	6,85	36,367	5,56	***	***	36,367	5,26
α -bisaboleno	***	***	***	***	36,375	2,44	***	***
<i>Trans</i> -nerolidol	***	***	***	***	***	***	39,583	4,27

*** Composto ausente na amostra.
TR: tempo de retenção em minutos.

O 1,8-cineol ($C_{10}H_{18}O$) é um monoterpeno óxido, estável e muito comum nos óleos essenciais. É praticamente insolúvel em água e miscível em álcool, clorofórmio, éter, ácido acético glacial e óleos (MERCK INDEX, 1996). Apresenta propriedades medicinais e pode ser utilizado interna ou externamente, sendo que neste último caso como anestésico e antisséptico (GUENTHER, 1957). O cineol é recomendado, na forma de cápsulas (100 mg/cápsula; capacidade tolerada 600 mg/dia) e inalações, para o tratamento de bronquite crônica, sinusite e infecções respiratórias, estimulando a expectoração, e também apresentou ação antiinflamatória em pacientes com bronquite asmática (JUERGENS *et al.*, 2003). Este componente majoritário do óleo apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra fungos, sendo até mais potente que o citronelal e o cariofileno (SAEED; SABIR, 1995). O 1,8-cineol têm ação repelente, e em um estudo foi verificada esta ação acompanhada de atividade tóxica contra algumas espécies de besouros, pestes que atacam grãos estocados, além de ter inibido o desenvolvimento dos ovos e das larvas do inseto (OBENG-OFORI *et al.*, 1997).

O cariofileno é um sesquiterpeno hidrocarboneto (C₁₅H₂₄) (GUENTHER, 1957). É também chamado de β -cariofileno ou *trans*-cariofileno, e ocorre na natureza como uma mistura com isocariofileno e α -cariofileno (MERCK INDEX, 1996).

O fato do 1,8-cineol ter sido encontrado em uma concentração abaixo de 70% (porcentagem definida para que o óleo tenha caráter medicinal) em todas as amostras pode ter relação com a idade das folhas. SILVESTRE *et al.* (1997) argumentaram que folhas jovens tendem a possuir menor taxa de eucaliptol. Apesar disto, em Jujuy (Argentina), encontrou-se 90,7% de eucaliptol no óleo de folhas jovens e frescas de *E. globulus* ssp. *bicostata*, obtido na primeira hora de destilação (VITURRO; MOLINA; HEIT, 2003).

Segundo VITTI e BRITO (2003), o teor de eucaliptol das folhas do *E. globulus* ssp. *bicostata* está entre 33 a 80% do óleo. No Uruguai, MANTERO *et al.* (2007) obtiveram a concentração de 87,33% de cineol em folhas frescas. No estudo feito por DAYAL e AYYAR (1986), na Índia, a concentração de 1,8-cineol do óleo de folhas secas foi de 73%. Em Cuba, o valor apresentado para este componente majoritário, identificado na essência das folhas frescas em uma pesquisa de sazonalidade, permaneceu entre 85 e 90% durante o ano (HERNÁNDEZ *et al.*, 1988). É importante ressaltar que a ação biológica do óleo essencial não se deve exclusivamente ao seu componente principal, pois na maioria dos estudos é proposto um sinergismo entre os elementos da essência.

Os outros dois compostos principais encontrados na literatura para o *E. globulus* ssp. *bicostata* foram os monoterpenos α -pineno e α -terpineol, nas concentrações de 4% e 0,7% (DAYAL e AYYAR, 1986), 2,5% e 2,3% (HERNÁNDEZ *et al.*, 1988) e 6,5% e 1,6% (VITURRO; MOLINA; HEIT, 2003), respectivamente. Neste estudo o α -pineno não foi encontrado, e o α -terpineol foi identificado apenas na amostra do óleo de folhas secas da coleta de outono, em concentração elevada de 15,96%.

Para outra subespécie do *E. globulus*, a ssp. *globulus*, a taxa de 1,8-cineol encontrada no óleo das folhas frescas foi de 63,8%, seguido dos constituintes α -pineno (14%), limoneno (3,6%), terpineno-4-ol (3,1%), globulol (3%) e aromadendreno (2%) (SILVESTRE *et al.*, 1997).

Há diversos fatores que podem influenciar na produção e na qualidade do óleo essencial do eucalipto, como a variabilidade genética, a idade da folha, o ambiente (solo e clima), os métodos de amostragem, a extração e a análise, e o

manejo da cultura (VITTI; BRITO, 2003). As variações qualitativas na composição do óleo são mais comuns entre as espécies, dentro das espécies a variabilidade é tipicamente quantitativa (BOLAND, BROPHY e HOUSE, 1991¹⁷ apud VITTI e BRITO, 2003). ZUZARTE *et al.* (2009) atribuíram ao fator genética as diferenças observadas na composição majoritária do óleo essencial da mesma espécie de lavanda coletada em localidades próximas umas das outras. Na pesquisa com a subespécie *bicostata*, as folhas jovens apresentaram pouco compostos quando comparados aos dados da literatura. Os fatores que podem ter interferido nesse resultado seriam a idade da folha, pois eram folhas novas e em desenvolvimento, e também o método de extração. Ocasionalmete a água pode não ser capaz de extrair todos os compostos presentes no óleo, por isso talvez fosse necessário utilizar mais um solvente, menos polar, para que houvesse maior esgotamento desses componentes.

Há muitas pesquisas com o óleo essencial das folhas da espécie *E. globulus*, da qual a subespécie *bicostata* pertence. Em um estudo com o óleo comercial, os principais compostos encontrados foram o 1,8-cineol (52,6%), α -felandreno (6,18%), α -terpinilacetato (3,68%), globulol (1,22%) e terpineno (1,12%). A maioria dos compostos identificados foi monoterpenos oxigenados (58,7%), e dentre os sesquiterpenos, a maioria dos compostos encontrados foi do tipo hidrocarboneto (7,02%) (SACCHETTI *et al.*, 2005). Os componentes em maior concentração obtidos a partir do óleo de folhas frescas e revelados por CIMANGA *et al.* (2002) foram: 1,8-cineol (44,3%), canfeno (23,1%), α -pineno (9,3%), globulol (7,3%), limoneno (5,1%), β -pineno (2,7%), ρ -cimeno (1,6%) e aromadendreno (1,3%). VILELA *et al.* (2009) obtiveram uma das mais altas taxas de cineol para o óleo de folhas frescas, 89,95%. BARTON, TJANDRA e NICHOLAS (1989) identificaram o aromadendreno e o globulol como os mais significativos sesquiterpenos desta espécie. Comparando esses resultados com os obtidos para o *E. globulus* ssp. *bicostata*, o único composto em comum encontrado foi o 1,8-cineol, e a concentração deste, nas folhas jovens, foi superior a do *E. globulus*, exceto no estudo de VILELA *et al.* (2009).

Os compostos monoterpênicos são predominantes no *E. globulus* e em suas subespécies (VILELA *et al.*, 2009; VITURRO; MOLINA; HEIT, 2003; SILVESTRE *et*

¹⁷ BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. *Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

al., 1997; NISHIMURA; CALVIN, 1979). E ainda, estes e os constituintes oxigenados, como o cineol, são as substâncias mais extraídas na primeira hora de hidrodestilação. Após este período o número de componentes extraídos aumenta, incluindo os sesquiterpênicos (BABU; SINGH, 2009; VILELA *et al.*, 2009; FRANCO, 2005; VITURRO; MOLINA; HEIT, 2003).

O óleo das folhas frescas de *E. cinerea* apresentou uma taxa maior de cineol (84,4%) do que o obtido das folhas secas por 24 horas (77,6%). Os pesquisadores deduziram que esta diferença pode estar relacionada ao processo de secagem, no qual pode ocorrer a evaporação do eucaliptol, inerente das suas propriedades termo-físicas. Entretanto, os outros terpenos principais limoneno e α -terpineol foram encontrados em menor concentração na folha fresca e em maior na folha seca (BABU; SINGH, 2009). O mesmo foi observado no *E. globulus* ssp. *bicostata*, a concentração do 1,8-cineol foi levemente superior em todas as estações das folhas frescas, exceto no outono e o acetato de α -terpineol em maior concentração nas folhas secas.

Analisando o composto majoritário 1,8-cineol, foi verificado que as diferenças entre a sua concentração ao longo do ano não foram bruscas, principalmente nas folhas frescas. Nestas a maior taxa de eucaliptol foi no verão, seguido do outono, inverno e primavera. Nas folhas secas, a estação que se destacou na concentração desta substância foi o outono, depois o verão, a primavera e o inverno. WILDY, PATE e BARTLE (2000) pesquisaram nove espécies de eucalipto e concluíram que a concentração de cineol foi maior no início do verão, comparando com o inverno. FABROWSKI (2002) verificou, no óleo de folhas adultas de *E. smithii*, que a maior concentração de cineol foi observada no verão (85,16%), seguido do outono (82,34%), primavera (80,44%) e inverno (78,25%). O autor ainda sugere que a época mais adequada para a coleta do material vegetal, para a exploração da essência, é aquela que apresentar a taxa mais elevada do composto majoritário, nesse caso o cineol, corroborando com a idéia de GOBBO-NETO e LOPES (2007), que afirmam que a época da coleta é importante, uma vez que a concentração e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos da planta é inconstante durante o ano.

Neste estudo foi observado que a estação do outono representou o melhor rendimento na extração do óleo essencial, tanto nas folhas frescas quanto nas secas, e também uma das mais altas concentrações do eucaliptol, 65,34% (folhas

secas) e 59,35% (folhas frescas). Esta seria, portanto, uma época apropriada para a coleta do material. Este fator é relevante quando se trata de um vegetal com possíveis aplicações terapêuticas.

Os terpenos e os terpenóides são, muitas vezes, os responsáveis pelas atividades biológicas das plantas. O mecanismo de ação dos terpenos não está completamente elucidado, mas acredita-se que envolve o rompimento da membrana do microrganismo através dos compostos lipofílicos (COWAN, 1999).

5.6 Atividade antioxidante

5.6.1 Método fosfomolibdênico

O Gráfico 2, está representado em porcentagem, a atividade antioxidante das amostras em relação à rutina e ao ácido ascórbico (considerado 100% de capacidade de redução), em um análise qualitativa.

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



Neste gráfico observa-se que nenhuma das amostras apresentou capacidade antioxidante superior ou próxima ao ácido ascórbico (100% de atividade). Os extratos etanólico, etanólico 70% e o óleo representaram, respectivamente, 23,27% \pm 0,44%, 24,17% \pm 0,69% e 25,72% \pm 0,38% de atividade.

Quanto à rotina, este flavonóide representou a mais baixa capacidade antioxidante em relação ao ácido ascórbico, $21,77\% \pm 0,44\%$. As amostras apresentaram resultados superiores a essa substância padrão-referência.

Os resultados das amostras foram significativamente diferentes do padrão de comparação, ou seja, o óleo essencial e os extratos apresentaram capacidade antioxidante, mas baixa, quando comparados ao ácido ascórbico.

No método do fosfomolibdênio é observada a capacidade antioxidante total da amostra, ou seja, a habilidade tanto em doar um par de elétrons (mecanismo redox), que depende da presença de compostos na amostra que possuam anéis fenólicos com duplas ligações, quanto em doar apenas um elétron ou um hidrogênio (mecanismo radicalar), que depende da presença de componentes com hidroxilas disponíveis. O resultado obtido nas amostras está relacionado a um ou à união desses dois mecanismos de redução.

Em relação aos extratos, o solvente utilizado e o procedimento de extração podem ter influenciado na resposta, uma vez que a determinação de fenólicos totais, que são compostos responsáveis pela atividade antioxidante em muitos vegetais, apresentou valor elevado. O processo de desengorduramento pelo qual o extrato passou pode também ter contribuído para a baixa atividade encontrada, pois prováveis substâncias antioxidantes podem ter sido extraídas nesta fase, diminuindo assim a sua capacidade redutora final. Em relação ao óleo essencial, a sua composição química pode auxiliar a esclarecer esse resultado. Foram revelados muito poucos compostos na CG/EM, e na amostra de óleo testada, pertencente à das folhas frescas do inverno, não há substâncias com anéis fenólicos, capazes de doar um par de elétrons, como o 1,8-cineol, e a única substância com uma única hidroxila é o *trans*-nerolidol.

É importante também considerar o método aplicado para a verificação da capacidade antioxidante e a concentração da amostra testada, pois a ação da rotina, que de fato é uma substância antioxidante, também foi baixa.

5.6.2 Método do DPPH

Para testar a atividade do óleo essencial foram utilizadas as concentrações de 0,6 a 6 mg/ml. Primeiramente foi determinada a cinética da reação, para observar o tempo necessário para a máxima redução do DPPH. O óleo essencial apresentou

uma cinética de reação muito longa, acima de 5 horas, e mesmo após este período as leituras das absorvâncias permaneceram altas e diminuíram muito lentamente, ao contrário do que deve acontecer com as amostras que apresentam alguma atividade. Nestas, a absorvância é muito mais baixa que a do controle, após a cinética da reação. A coloração da solução do óleo permaneceu praticamente a mesma desde o princípio do teste, sendo que deveria descolorir do tom róseo para o amarelado (Figura 13).

Com os dados da fórmula foi possível obter o valor do EC_{50} , determinado pela porcentagem de atividade antioxidante em função das diferentes concentrações do óleo essencial (Gráfico 3).

O óleo essencial do *E. globulus* ssp. *bicostata* não demonstrou, mesmo em concentrações muito altas (6 mg/ml), capacidade relativa considerável em sequestrar/reduzir o radical DPPH. O mesmo resultado negativo foi verificado para o óleo de *Eucalyptus globulus*, AMAKURA *et al.* (2009) verificaram um EC_{50} acima de 100 mg/ml. Para o componente majoritário do óleo, o 1,8-cineol, foi encontrado um EC_{50} acima de 100 $\mu\text{mol/l}$ (AMAKURA *et al.*, 2002). Segundo os autores, o componente eucaliptol não apresenta atividade antioxidante relevante, e a sua ação depende da concentração em que se encontra no óleo, sendo esta influenciada pela origem do material, pelos métodos de preparação e pelo solvente utilizado.

SACCHETTI *et al.* (2005) observaram que o óleo de *E. globulus* juntamente com o óleo de *Psidium guajava*, ambos pertencentes à família Myrtaceae, foram os que menos apresentaram atividade antioxidante dentre as essências testadas, e concluíram que óleos ricos em certos monoterpenos são praticamente ineficazes na redução do radical livre DPPH. Assim como REBELO *et al.* (2009) verificaram que o óleo essencial das folhas de *Hyptis crenata* (Lamiaceae) também não demonstrou capacidade antioxidante ($EC_{50} = 6\ 882,7\ \mu\text{g/ml}$), além de possuir longa cinética de reação. Os principais componentes identificados nesse óleo foram α -pineno, 1,8-cineol e β -pineno. CHOI *et al.* (2000) reportaram que os óleos de espécies de *Citrus* ricos em terpineno e terpinoleno apresentaram significativa neutralização do radical DPPH. Os óleos com maiores concentrações em compostos aromáticos fenólicos, como o alilbenzeno eugenol, apresentam maior capacidade antioxidante pela presença de hidroxila doadora de elétron ou hidrogênio (PEREIRA; MAIA, 2007).

O estudo de SIMIONATTO *et al.* (2007) verificou um EC_{50} de 3,2 mg/ml para o óleo essencial das cascas do caule de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae) e a fração

antioxidante isolada do óleo bruto apresentou um valor de 1,05 mg/ml para o EC₅₀. Os compostos principais presentes nesta fração, como os sesquiterpenos α -bisabolol (38,3%) e α -eudesmol (9,3%), na composição majoritária do óleo bruto representaram rendimentos muito baixos, menos que 3%. Este resultado sugere que o óleo deva agir em sinergismo e que os compostos majoritários não são os únicos responsáveis pela atividade.

A composição química do *E. globulus* ssp. *bicostata* apresentou, na amostra do óleo testado obtido das folhas frescas do inverno, apenas o sesquiterpeno *trans*-nerolidol com uma hidroxila, o que não permite um alto poder antioxidante, além da presença majoritária do 1,8-cineol, considerado sem atividade redutora.

Portanto, um dos fatores da baixa capacidade antioxidante do óleo da subespécie testada pode ser atribuído a sua composição química, uma vez que a habilidade em sequestrar/reduzir radicais livres depende dos compostos presentes no óleo, da concentração em que se encontram e do sinergismo dos componentes da essência, e não só do composto majoritário, como nesse caso, o 1,8-cineol.

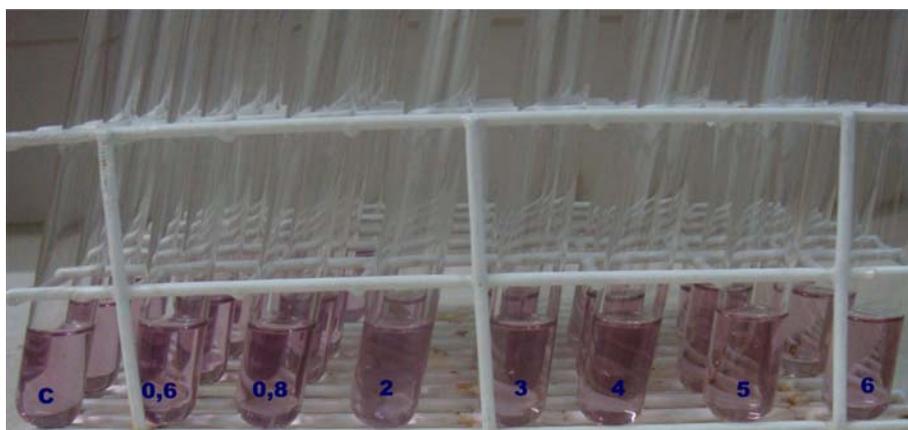
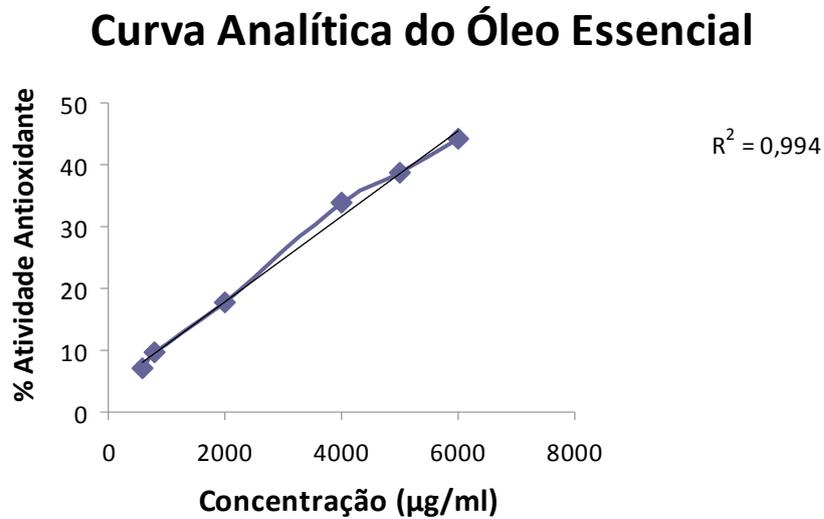


FIGURA 13 – AMOSTRAS DO ÓLEO ESSENCIAL EM CONCENTRAÇÕES DE 0,6 A 6 mg/ml NO TESTE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM O DPPH. C=CONTROLE

GRÁFICO 3 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL PELO MÉTODO DO DPPH



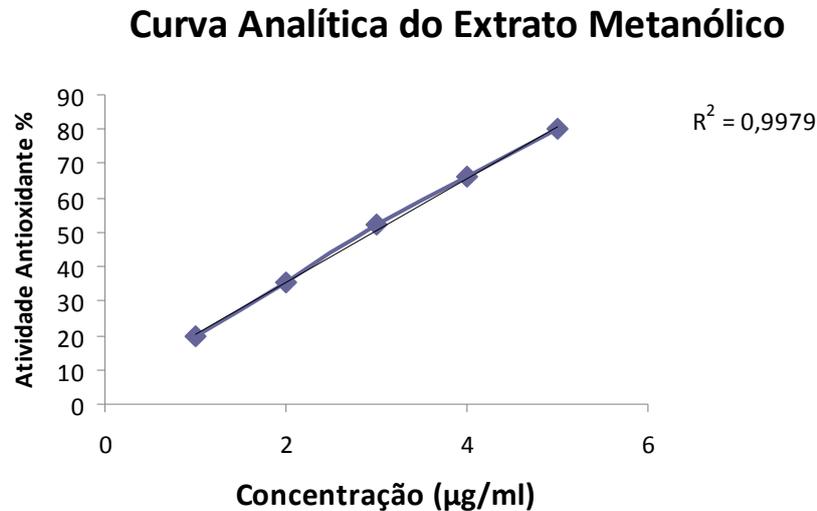
O extrato metanólico foi testado nas concentrações de 1 a 5 µg/ml. O rendimento do extrato liofilizado foi de 3,4 g%. A cinética da reação foi relativamente rápida, 45 minutos. A velocidade da mudança de coloração do rosa para o amarelo evidenciou que quanto maior a concentração testada mais rápida foi a reação colorimétrica e maior foi a capacidade antioxidante (Figura 14).

Com os dados da fórmula foi possível obter o valor do EC₅₀, determinado pela porcentagem de atividade antioxidante em função das diferentes concentrações do extrato (Gráfico 4).



FIGURA 14 – AMOSTRAS DO EXTRATO METANÓLICO EM CONCENTRAÇÕES DE 1 A 5 µg/ml NO TESTE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM O DPPH

GRÁFICO 4 – CURVA ANALÍTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO PELO MÉTODO DO DPPH



Padrões: as concentrações testadas para o ácido ascórbico foram de 0,078 a 5 µg/ml e para a rutina entre 0,625 e 5 µg/ml.

A partir das curvas fornecidas pelos gráficos, foi determinado o EC_{50} das amostras e dos padrões substituindo o y da equação pelo valor de 50. O EC_{50} corresponde à concentração da amostra que reduz em 50% o radical DPPH. A resposta foi fornecida em µg/ml. Quanto menor o valor do EC_{50} , maior será a atividade antioxidante da amostra.

Na Tabela 6, observam-se os resultados da capacidade de neutralização do DPPH dos padrões e das amostras, através da atividade em porcentagem na concentração máxima testada 5 µg/ml (padrões e extrato metanólico) e do EC_{50} .

TABELA 6 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES E DAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DO DPPH

PADRÕES/ AMOSTRAS	ATIVIDADE EM % NA CONCENTRAÇÃO 5 µg/ml	EC_{50} (µg/ml)
Ácido Ascórbico	96	2,51
Rutina	86,3	2,86
Extrato Metanólico	79,86	2,95
Óleo Essencial	---	> 6 000

Através desses resultados foi observado um grande potencial antioxidante do extrato metanólico, pois o valor do EC₅₀ é muito próximo ao do flavonóide rutina e ao do potente antioxidante ácido ascórbico. ALMEIDA *et al.* (2009) também obtiveram um EC₅₀ baixo para o extrato etanol/água das folhas de *Eucalyptus globulus*, 12 µg/ml, quando comparado com o padrão ácido ascórbico (EC₅₀= 4,93 µg/ml). VÁZQUEZ *et al.* (2008) verificaram que o melhor resultado da atividade antioxidante das cascas de *E. globulus*, através da técnica de redução do complexo Fe³⁺/tripiridiltriazina (TPTZ) para a forma azul ferrosa (Fe²⁺/TPTZ), foi o encontrado no extrato metanol/água. As frações do extrato de acetato de etila ressuspendido em metanol, obtido da madeira de *E. globulus*, apresentou o menor EC₅₀ de 150 µg/ml, sendo que este valor foi calculado pela redução da absorbância do extrato em contato com o DPPH, em UV, em um tempo de 0 a 16 minutos (CRUZ; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2005). Analisando e comparando um extrato comercial de eucalipto, usado como aditivos em alimentos para prevenir a deterioração dos mesmos por danos oxidativos, com extratos hidroalcoólicos 50% de folhas frescas e secas de *E. globulus*, AMAKURA *et al.* (2009) obtiveram um EC₅₀ de 19 µg/ml, 19,1 µg/ml e 24,7 µg/ml, respectivamente, já o extrato clorofórmico apresentou um elevado EC₅₀ de 162, 7 µg/ml (folhas frescas) e de 477 µg/ml (folhas secas) e baixa concentração de polifenóis totais.

Os solventes mais polares como o metanol e o etanol, devem fornecer os melhores rendimentos e maior abundância em fenóis totais, isso porque devem extrair e disponibilizar mais substâncias com um grupo hidroxila capaz de doar elétron (MENSOR *et al.*, 2001). Portanto, quanto maior a concentração de fenóis, maior será a atividade antioxidante do vegetal (PESSUTO *et al.*, 2009; AMAKURA *et al.*, 2009; VÁZQUEZ *et al.*, 2008; SHAN *et al.*, 2005; QIAN; NIHORIMBERE, 2004), e esta capacidade de sequestrar/reduzir radicais livres é determinada pela estrutura molecular, mais especificamente pela posição da hidroxila na estrutura do anel (QIAN; NIHORIMBERE, 2004).

A ação antioxidante dos fenóis pode ocorrer através de vários mecanismos, como o bloqueio, a interferência ou a supressão das atividades das enzimas envolvidas na geração das espécies reativas de oxigênio; por meio da neutralização dos radicais livres, tornando-os estáveis e agindo como quelantes de metais em transição, deixando-os inativos (MOSQUERA; CORRERA; NIÑO, 2009).

AMAKURA *et al.* (2009) encontraram no extrato metanólico das folhas da espécie *E. globulus*, através de picos fornecidos pelo HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), as substâncias oenoteína (tanino hidrolisável de estrutura macrocíclica conhecido por apresentar diversas atividades biológicas), quercetina, ácido clorogênico, ácidos elágico e gálico. Estes dois últimos são frequentemente reportados nos produtos naturais como antioxidantes, e normalmente são produtos da degradação dos taninos hidrolisáveis (elagitaninos e galotaninos) durante o processo de secagem e/ou isolamento, mas também podem ser encontrados na forma livre como metabólitos secundários das plantas. A capacidade antioxidante dos compostos livres ácidos elágico e gálico foi testada na técnica do DPPH e apresentou EC_{50} de 13,6 $\mu\text{mol/l}$ e 18,3 $\mu\text{mol/l}$, respectivamente, muito abaixo do encontrado para os padrões BHT (84,2 $\mu\text{mol/l}$) e BHA (37,8 $\mu\text{mol/l}$) (AMAKURA *et al.*, 2002).

De acordo com os dados da literatura e com o valor obtido de fenóis totais para o *E. globulus ssp. bicostata* (118,35 mg em equivalentes de ácido gálico/g de amostra) é possível explicar o baixo valor do EC_{50} , ou seja, a capacidade do extrato metanólico em doar um H^+ ou um elétron para redução do radical DPPH tem relação com a elevada taxa de compostos fenólicos.

JIROVETZ *et al.* (2007), testando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Corymbia citriodora*, verificaram que a capacidade da amostra em sequestrar/reduzir o radical DPPH foi menor ($EC_{50} = 344 \mu\text{g/ml}$; padrão ácido ascórbico $EC_{50} = 4,2 \mu\text{g/ml}$) do que a ação sobre o radical $\cdot\text{OH}$ ($EC_{50} = 0,38 \mu\text{g/ml}$), sendo que esta última técnica corresponde na proteção do açúcar desoxirribose contra a degradação em um meio contendo ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe^{3+} . A eliminação da hidroxila reativa pelo óleo foi superior ao padrão quercetina ($EC_{50} = 4,61 \mu\text{g/ml}$). Diante das metodologias do DPPH e do fosfomolibdênio, o extrato metanólico de *Stachys betonica* (Lamiaceae) também apresentou resultados diferentes. Enquanto foi o menos eficiente para neutralizar o DPPH, no teste do poder redutor pela formação do complexo fosfomolibdênio revelou um dos maiores potenciais dentre todos os extratos testados (MATKOWSKI; PIOTROWSKA, 2006). Estas diferenças de atividade de acordo com o método utilizado prova que há mecanismos diversos e complexos, tanto para a inibição da oxidação quanto para a neutralização dos radicais livres. Por isso uma técnica pode apresentar melhores

resultados do que outra, e os resultados de cada método não devem ser comparados entre si se o princípio de reação não for o mesmo.

As diferenças de resultados entre os extratos e o óleo essencial têm relação com a composição química de cada amostra. O óleo essencial é rico em 1,8-cineol, um monoterpene sem atividade antioxidante, além de apresentar apenas o componente *trans*-nerolidol com uma hidroxila. O extrato metanólico revelou elevada concentração de compostos fenólicos, que são altamente antioxidantes e possuem hidroxilas disponíveis para neutralizar o DPPH.

A metodologia do DPPH apresentou certas dificuldades em sua realização, pois os ensaios tiveram que ser repetidos para desconsiderar o fator temperatura, uma vez que houve resultados diferentes frente a esta variável, principalmente com os padrões.

Portanto, o extrato metanólico, dentre as amostras testadas e na técnica de redução do radical DPPH, foi o que apresentou o melhor resultado, caracterizando o extrato das folhas do *E. globulus* ssp. *bicostata* como antioxidante. Há diversas aplicações para substâncias com esta propriedade, como na indústria terapêutica e alimentícia.

5.7 Atividade antifúngica

Todos os gêneros testados nesta pesquisa pertencem à divisão Deuteromycota, conhecida também por fungos imperfeitos, e classe Blastomycetes (McGINNIS¹⁸ apud LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991), que são leveduras sem estado sexuado, unicelulares, com ou sem pseudomicélio, ou com ou sem micélio verdadeiro rudimentar (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

A técnica de difusão testada com o óleo de *E. globulus* ssp. *bicostata* forneceu dados qualitativos, uma vez que a natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais pode não permitir a difusão uniforme destas substâncias através do meio com o ágar (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Entretanto, essa característica de insolubilidade das essências tornou o método do disco o mais aplicável para um teste preliminar, devido à dificuldade de encontrar um solvente adequado que facilitasse a solubilidade da amostra sem que interferisse nos resultados. Ainda que

¹⁸ McGINNIS, M. R. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. New York: Academic Press, 1980.

o óleo tenha sido diluído com o Tween 80 a 10%, para aplicação no disco, essa solução não poderia ser utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima em caldo, pois a solução de óleo essencial, Tween 80 e água destilada é turva, e a turbidez do meio originada pelo crescimento dos fungos não poderia ser visualizada de forma confiável.

Os resultados do teste revelaram que o óleo essencial de *E. globulus* ssp. *bicostata* apresenta potencial como antifúngico. O óleo bruto inibiu as 13 cepas testadas (Tabela 7), sem que houvesse dificuldades na difusão da amostra. A *Malassezia pachydermatis* foi a levedura mais sensível à ação do óleo. O diâmetro do halo de inibição obtido foi 42,83 mm ± 3,3292 mm, seguido pelas espécies *Rhodotorula* sp. (32,33 mm ± 2,3094 mm) e *Cryptococcus neoformans* (31 mm ± 1,00 mm). Estes foram os três melhores resultados, apresentando inibição do crescimento da cepa superior a 30 mm de diâmetro. As duas espécies mais resistentes foram *Candida parapsilosis* (23,5 mm ± 0,00 mm) e *C. pelliculosa* (24 mm ± 1,00 mm). Em relação à espécie *C. albicans*, responsável pela maioria das infecções fúngicas, o óleo inibiu o seu crescimento formando um halo de tamanho intermediário (25,67 mm ± 1,893 mm), em relação às espécies mais sensíveis e mais resistentes. Assim como em todas as outras leveduras, em que as medições realizadas foram entre 25 e 28,5 mm. Estatisticamente, o desenvolvimento da espécie *Malassezia pachydermatis* foi o mais inibido pela atividade do óleo bruto. As diferenças entre os resultados das outras espécies testadas não são significativas entre si.

Resultados encontrados na literatura também revelaram a ação antifúngica do eucalipto na técnica de difusão em ágar.

A espécie *Eucalyptus citriodora* inibiu o crescimento das cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (ARAÚJO *et al.*, 2004; DUTTA *et al.*, 2007) e de *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (LIMA *et al.*, 2006). Os óleos essenciais de *Eucalyptus deglupta*, *E. saligna*, *E. camaldulensis* var. *catharine* e *E. camaldulensis* var. *mysore* também foram eficazes contra o crescimento da levedura *C. albicans* (OYEDEJI *et al.*, 1999), mas os óleos de *E. robusta* e *E. saligna* apresentaram baixa atividade contra este fungo (SARTORELLI *et al.*, 2007). O óleo de *E. globulus* inibiu o crescimento de *Candida albicans*, por meio de um halo de inibição de 26,7 a 27,2 mm (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2008).

O Tween 80 a 10% foi testado como controle negativo, e como não apresentou ação antifúngica contra as cepas, foi utilizado na diluição do óleo.

Na concentração 75%, a inibição dos microrganismos ocorreu em níveis diferentes (Tabela 7). Em *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigelii* e *T. asahii* o óleo diluído não foi capaz de impedir o crescimento das leveduras, ou seja, não houve a formação do halo de inibição. Assim como no óleo bruto, a espécie mais sensível à ação do óleo 75% foi a *Malassezia pachydermatis* (25,5 mm ± 0,8660 mm). Nas outras espécies a atividade antifúngica do óleo formou halos de inibição de crescimento entre 19,6 e 21,5 mm.

TABELA 7 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO, DA DILUIÇÃO 75% E DO PADRÃO NISTATINA POR MEIO DA MEDIÇÃO DO DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO*

MICROORGANISMOS	ÓLEO BRUTO**	ÓLEO 75%**	PADRÃO NISTATINA (100 U.I.)
<i>Candida parapsilosis</i>	23,5 ± 0,00 ^l	0	23,5
<i>Candida pelliculosa</i>	24 ± 1,00 ^{e,f}	21,5 ± 0,8660 ^b	14
<i>Candida tropicalis</i>	25,67 ± 1,6073 ^{d,e,f}	19,67 ± 0,2887 ^b	16
<i>Candida albicans</i>	25,67 ± 1,893 ^{d,e,f}	20 ± 1,00 ^b	25,5
<i>Candida famata</i>	26 ± 1,00 ^{d,e,f}	0	28
<i>Candida krusei</i>	26,33 ± 1,7559 ^{d,e,f}	20,33 ± 0,5774 ^b	12
<i>Candida glabrata</i>	28,5 ± 2,5981 ^{c,d}	0	18
<i>Candida guilliermondii</i>	27,67 ± 0,5774 ^{c,d,e}	19,67 ± 2,0817 ^b	16
<i>Trichosporon beigelii</i>	27 ± 1,00 ^{d,e,f}	0	14
<i>Trichosporon asahii</i>	28 ± 0,00 ^{c,d}	0	19,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	31 ± 1,00 ^{b,c}	20,5 ± 0,00 ^b	22
<i>Rhodotorula</i> sp.	32,33 ± 2,3094 ^b	21,5 ± 2,2913 ^b	27
<i>Malassezia pachydermatis</i>	42,83 ± 3,3292 ^a	25,5 ± 0,8660 ^a	40
Coeficiente de variação	5,931%	5,929%	

* Valores em mm. ** Média obtida da triplicata.

Médias acompanhadas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de DMS ($p \geq 0,01$).

Zero= não houve inibição do crescimento do fungo.

Foi observado que o óleo bruto e diluído agiram de maneira independente frente aos fungos, isto é, não houve um decréscimo proporcional da atividade no óleo a 75% em comparação com o óleo puro. Por exemplo, em *C. krusei* formou-se um halo de 26,33 mm e em *Cryptococcus neoformans* um halo de 31 mm, com o óleo bruto. Entretanto, no óleo diluído a ação foi similar nas duas espécies, 20,33 mm e 20,5 mm, respectivamente.

O óleo também foi testado na concentração 50%, mas nesta diluição não apresentou atividade inibitória do crescimento de nenhuma das leveduras.

Através do teste T verificou-se a variância entre os resultados de inibição do óleo bruto e do óleo a 75%. O teste estatístico revelou que a ação do óleo bruto foi superior e significativamente diferente do óleo a 75% em todas as espécies, exceto em *Candida pelliculosa* e em *C. albicans* que não houve variância significativa de inibição nas duas concentrações.

As diferenças entre os halos de inibição podem ser explicadas pelas características próprias de cada espécie de levedura e seus mecanismos intrínsecos de resistência, e também da sua interação com os diversos componentes da essência, podendo então ser mais ou menos sensíveis à atividade deste óleo essencial.

O padrão antifúngico testado foi a nistatina. Esta substância é um polieno com mecanismo parecido ao da anfotericina B, pois inibe o ergosterol, que é um componente da membrana plasmática fúngica. Em concentrações adequadas forma poros na membrana que permite a perda de potássio, levando a morte do fungo. A nistatina é obtida a partir do *Streptomyces noursei* Brown *et al.* Em candidíases cutâneas e cutâneo-mucosas é usada em forma de pomada, mas também pode ser aplicada por via venosa (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Na Tabela 7 observa-se o diâmetro do halo de inibição do padrão nistatina, que assim como no óleo essencial, foi maior no fungo *Malassezia pachydermatis* (40 mm). O menor halo foi observado em *C. krusei* (12 mm).

Como os discos de nistatina testados possuíam 6 mm de diâmetro e os discos impregnados com o óleo essencial 10 mm, a forma determinada para comparação dos resultados foi mensurar a região de inibição fúngica entre a borda do disco e o início do crescimento da levedura. Assim foram desconsiderados os diferentes tamanhos dos discos. A comparação foi feita apenas com o óleo bruto, pois este apresentou os melhores resultados.

Na Tabela 8 verifica-se que a atividade do óleo essencial bruto foi superior à nistatina em todas as espécies testadas, exceto em *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida famata* e *Malassezia pachydermatis*, sendo que nesta há pouca diferença na inibição. No gráfico 5 é possível visualizar os dados fornecidos na tabela 8 (MALINOWSKI *et al.*, 2009).

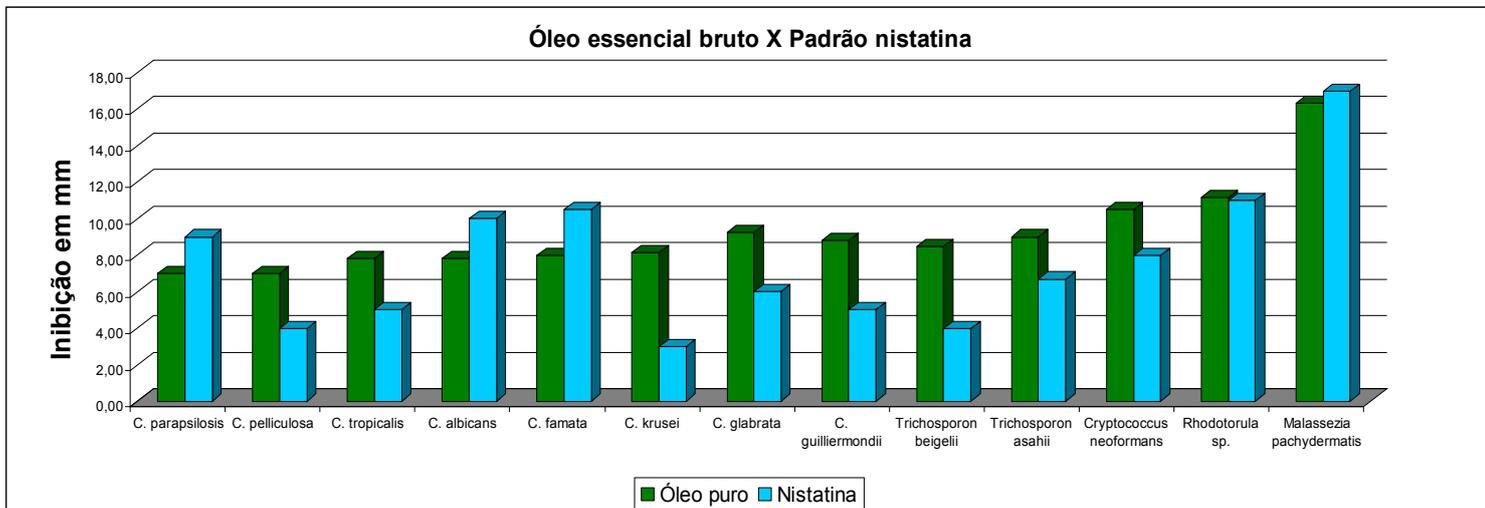
TABELA 8 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO E DO PADRÃO NISTATINA POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO E O CRESCIMENTO FÚNGICO*

MICROORGANISMOS	ÓLEO BRUTO** ⁽¹⁾	PADRÃO NISTATINA (100 U.I.)
<i>Candida parapsilosis</i>	7± 0,00 ^e	9
<i>Candida pelliculosa</i>	7± 0,5 ^e	4
<i>Candida tropicalis</i>	7,8± 0,7937 ^{d,e}	5
<i>Candida albicans</i>	7,8± 0,9644 ^{d,e}	10
<i>Candida famata</i>	8± 0,5 ^{d,e}	10,5
<i>Candida krusei</i>	8,13± 0,9018 ^{d,e}	3
<i>Candida glabrata</i>	9,23± 1,2702 ^{c,d}	6
<i>Candida guilliermondii</i>	8,83± 0,2887 ^d	5
<i>Trichosporon beigelii</i>	8,5± 0,5 ^{d,e}	4
<i>Trichosporon asahii</i>	9± 0,00 ^{c,d}	6,7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	10,5± 0,5 ^{b,c}	8
<i>Rhodotorula sp.</i>	11,17± 1,1547 ^b	11
<i>Malassezia pachydermatis</i>	16,33± 1,5275 ^a	17
Coeficiente de variação	7,89%	

* Valores em mm. ** Média obtida da triplicata.

⁽¹⁾ Médias acompanhadas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de DMS ($p \geq 0,01$).

GRÁFICO 5 – COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO E DO PADRÃO NISTATINA POR MEIO DA MEDIÇÃO DA REGIÃO DE INIBIÇÃO ENTRE A BORDA DO DISCO E O CRESCIMENTO FÚNGICO EM MM



Em *C. pelliculosa*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon beigeli*, *T. asahii* e *Cryptococcus neoformans*, a ação do óleo bruto foi superior à da nistatina. Em *Rhodotorula sp.* a atividade do padrão foi semelhante à da amostra, e apenas em *Malassezia pachydermatis*, *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. famata* a nistatina agiu como melhor antifúngico.

Os antibióticos interferem com diferentes mecanismos na célula fúngica, causando sua morte, chamada ação fungicida, ou somente inibindo o seu crescimento, chamada atividade fungistática. Embora os antifúngicos sejam normalmente divididos nas duas categorias, algumas drogas tipicamente fungistáticas podem ser fungicidas para determinadas espécies. Clinicamente, os dois tipos são eficientes, mas se tratando de pacientes imunocomprometidos, é preferível o uso de fungicidas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Quanto ao ensaio da capacidade fungistática/fungicida os resultados obtidos são demonstrados na Tabela 9.

TABELA 9 – ATIVIDADE FUNGISTÁTICA/FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL BRUTO

MICROORGANISMOS	FUNGISTÁTICA	FUNGICIDA
<i>Candida parapsilosis</i>	X	
<i>Candida pelliculosa</i>	X	
<i>Candida tropicalis</i>		X
<i>Candida albicans</i>		X
<i>Candida famata</i>	X	
<i>Candida krusei</i>	X	
<i>Candida glabrata</i>		X
<i>Candida guilliermondii</i>		X
<i>Trichosporon beigeli</i>	X	
<i>Trichosporon asahii</i>	X	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	X	
<i>Rhodotorula</i> sp.	X	
<i>Malassezia pachydermatis</i>		X

O óleo apresentou atividade fungicida sobre cinco espécies, ou seja, causou a morte dessas leveduras. Esse resultado é relevante, pois dentro desse grupo encontra-se a *C. albicans*, importante agente infeccioso que apresenta elevada resistência a medicamentos sintéticos, e cuja susceptibilidade frente a princípios vegetais vem sendo amplamente estudada. As outras espécies desse grupo, *Malassezia pachydermatis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* também já apresentaram baixa sensibilidade aos antifúngicos tradicionais. Segundo alguns estudos, o uso profilático de fluconazol aumentou a taxa de colonização e infecção por *Candida glabrata* e *C. krusei* nos hospitais (MAERTENS; BOOGAERTS, 2000). O patógeno *Malassezia pachydermatis* é tratado com o antifúngico tiabendazol, mas a levedura já demonstrou resistência e sensibilidade intermediária ao medicamento (NASCENTE *et al.*, 2009).

A comparação de amostras com potencial antimicrobiano pode ser afetada pelas diferenças existentes nas propriedades físicas de cada uma delas, como solubilidade, volatilidade e difusão no ágar (SCORZONI *et al.*, 2007), além das diversas condições do teste, como crescimento microbiano, tempo de exposição do

microrganismo ao óleo e quantidade de emulsificador (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Por isso o resultado não foi comparado diretamente com outros estudos.

Com os dados da pesquisa antifúngica, algumas afirmações puderam ser realizadas.

O óleo essencial apresentou atividade antifúngica contra todas as espécies de casos clínicos testadas, ampliando desta maneira o espectro de ação do óleo essencial de eucalipto, pois na maioria dos estudos encontrados ele é testado apenas contra *Candida albicans* e algumas outras espécies desse mesmo gênero.

O óleo bruto teve ação superior às diluições. A levedura *Malassezia pachydermatis* foi a mais sensível, tanto na ação do óleo como no padrão nistatina.

Em relação ao padrão, em oito espécies o óleo apresentou maior ação antifúngica, e em outras duas a inibição do padrão e da amostra foram muito próximas. Portanto, a essência de *E. globulus* ssp. *bicostata* é um agente inibidor de microrganismos fúngicos.

A ação fungicida do óleo contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *Malassezia pachydermatis* revela que cada espécie reage de maneira distinta frente a uma substância com potencial antifúngico. Sendo a amostra um óleo essencial, aumentam-se as probabilidades de diferenças nos resultados, pois a essência é uma mistura de componentes que podem agir em sinergismo e de forma diferente em organismos. Óleos de espécies que apresentam a mesma ação podem não possuir componentes majoritários iguais em sua constituição. Portanto, a composição química é um fator determinante na atividade biológica do óleo essencial e é difícil atribuir a ação a um único e particular composto.

SARTORELLI *et al.* (2007) atribuíram a atividade antibacteriana do óleo de *E. robusta* à elevada concentração de monoterpenos, como α -, β -pineno e limoneno. LOW, RAWAL e GRIFFIN (1974) verificaram em *E. citriodora* que a ação conjunta dos compostos citronelal e citronelol, presentes no óleo, é superior quando comparada com a atividade isolada de cada um dos elementos. A atividade do óleo de *E. staigeriana* contra o fungo *C. albicans*, segundo os autores, teve relação com o composto geraniol presente, além do linalol, terpineno, *p*-cimeno, α -pineno e α -terpineol, que mesmo em menores concentrações devem ter contribuído juntos para a ação (GILLES *et al.*, 2010). PATTNAIK *et al.* (1997) concluíram que a concentração inibitória mínima do óleo de *E. globulus*, testado como antimicrobiano, é menor na essência bruta do que nos compostos majoritários isolados.

Do ponto de vista de atividade biológica, foi demonstrado que em espécies de eucaliptos os componentes em maior concentração são relativamente inativos, como o α -pineno e o 1,8-cineol, e os compostos em minoria devem agir em sinergismo (HARRIS, 2002; FRANCO, 2005). Comprovando esta afirmação, VILELA *et al.* (2009) verificaram a atividade antifúngica do componente majoritário do óleo de *E. globulus*, 1,8-cineol, e observaram que este só apresentou efeito na maior concentração testada, provando que o composto principal nem sempre é o único responsável pela ação antifúngica, ou seja, deve haver um sinergismo entre os outros elementos em menor concentração do óleo essencial. Este fato também foi observado por CIMANGA *et al.* (2002), que ainda relataram que a presença de algumas classes de compostos nos óleos essenciais, como alcoóis, aldeídos, alcenos, ésteres e éteres, podem influenciar na atividade antimicrobiana dos eucaliptos. SACCHETTI *et al.* (2005) também observaram que óleos ricos em fenóis, aldeídos e alcoóis apresentam boa atividade contra fungos e leveduras.

É possível fazer uma relação destes estudos com a concentração obtida de 1,8-cineol na subespécie em estudo, que foi menor que 70%, mais precisamente 54,35%, mas apresentou atividade significativa contra as leveduras. Na amostra de óleo testada, das folhas secas da coleta de verão, também foram identificados os compostos acetona (1,36%), isovaleraldeído (2,37%), sesquiterpeno cariofileno (5,56%) e acetato de α -terpineol (19,6%). Apesar de a amostra possuir apenas dois tipos de terpenos, que foram identificados, segundo a literatura citada as outras substâncias também apresentam ação biológica e podem ter agido em sinergismo para que houvesse a atividade antifúngica.

Outras pesquisas mais aprofundadas seriam indicadas para o desenvolvimento de um produto de uso tópico, uma vez que quanto à permeabilidade o óleo não apresentaria dificuldades. Um exemplo disto é a utilização de monoterpenos, como o 1,8-cineol, que auxiliam a penetração e aumentam a eficácia de medicamentos tópicos, como o Tamoxifeno, usado na terapia pós-cirúrgica no câncer de mama (HARRIS, 2002).

A tendência é encontrar mecanismos que minimizem o desenvolvimento de resistência a drogas utilizadas, ao invés de fabricar antibióticos mais fortes. Por isso, o óleo também poderá ser indicado para agir em sinergismo com medicamentos sintéticos, como é o caso em tratamentos de infecções superficiais e profundas

causadas por *C. albicans* (HARRIS, 2002), uma vez que os resultados encontrados provaram a ação antifúngica do óleo essencial de *E. globulus* ssp. *bicostata*.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, foi possível chegar às seguintes conclusões:

As características morfoanatômicas evidenciadas são aquelas comumente encontradas em representantes da família Myrtaceae e no gênero *Eucalyptus*.

A folha jovem apresentou cera epicuticular diferenciada, na face abaxial do tipo cristalóide túbulo e na face adaxial do tipo cristalóide filamentosa.

O estudo fitoquímico revelou a presença de diversos metabólitos secundários de interesse comercial: glicosídeos flavônicos, antraquinônicos, saponínicos e antociânicos, além de taninos e esteróides e triterpenóides.

A análise de fenólicos totais demonstrou uma concentração significativa desses componentes, o que indicou a possibilidade de atividade biológica das folhas.

Os resultados das análises físico-químicas do óleo essencial estão de acordo com os dados da literatura para óleos deste gênero e para essências medicinais.

Foi encontrado um alto rendimento do óleo essencial, tanto nas folhas frescas quanto nas folhas secas.

Houve poucos compostos identificados no óleo essencial, dentre eles os principais encontrados nas folhas frescas e secas foram o monoterpeneo 1,8-cineol, o acetato de α -terpineol e o sesquiterpeneo cariofileno.

Para folhas jovens, a concentração de 1,8-cineol encontrada foi elevada, considerando as variáveis folhas secas e frescas e a sazonalidade.

A constância dos resultados, tanto no valor do rendimento quanto na concentração do eucaliptol, permite que a coleta das folhas, visando ao óleo essencial, seja feita em qualquer período do ano.

Dentre as metodologias aplicadas para a atividade antioxidante, a técnica de redução do radical DPPH forneceu os melhores resultados.

O extrato metanólico das folhas apresentou alta capacidade antioxidante para reduzir o DPPH, próxima dos padrões. O óleo essencial foi ineficaz em reduzir este radical.

A presença de compostos fenólicos no extrato e a ausência deles na essência é o fator determinante nos resultados encontrados para a atividade antioxidante.

A inibição do crescimento das 13 cepas testadas pelo óleo essencial indicou qualitativamente o seu potencial antifúngico.

Sugere-se que seja realizada a identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato de *E. globulus* ssp. *bicostata*, a confirmação dos componentes revelados no óleo essencial, juntamente com suas concentrações, e a concentração inibitória mínima da atividade antifúngica. Uma vez que foi demonstrada atividade biológica das folhas neste estudo, esses ensaios complementares contribuirão para o possível desenvolvimento de um produto.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, v.165, p.13-19, 2008.
- ALLEGRI, M.; SIMÉON, M.; MAILLOS, H.; BOILOOT, A. Èmulsions et applications en microbiologie. **Travaux de la Societe de pharmacie de Montpellier**, v.33, p.73-86, 1973.
- 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.
- ALVES, S. H.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, J. M.; LUBECK, I.; CASALI, A. K.; VAINSTEIN, M. H. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.43, n.5, p.267-270, 2001.
- ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.192-196, 2006.
- AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S.; ITO, 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, n.1, p.47-56, 2002.
- AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M.; SUGIMOTO, N.; YAMAZAKI, T.; YOSHIDA, T. Marker constituents of the natural antioxidant *Eucalyptus* leaf extract for the evaluation of food additives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, n.5, p.1060-1065, 2009.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, n.4, p.399-436, 2003.
- ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O. de; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; FILHO, L. S. Ação antimicrobiana de óleos sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v.33, n.1, p.55-64, 2004.
- BABU, G. D. K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.226-231, 2009.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BALACS, T. Cineole - Rich *Eucalyptus*. **The International Journal of Aromatherapy**, v.8, n.2, p.15-21, 1997.

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v.3, n.2, p.81-88, 2008.

BARTHLOTT, 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.

BARTON, A. F. M.; TJANDRA, J.; NICHOLAS, P. G. Chemical evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, p.1253-1257, 1989.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P.; KOHLI, R. K.; KAUR, S. *Eucalyptus* essential oil as a nature pesticide. **Forest Ecology and Management**, v.256, n.12, p.2166-2174, 2008.

BAUER, W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BAYDAR, N. G.; OZKAN, G.; YASAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, v.18, p.1131-1136, 2007.

BERLYN G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Iowa University, 1976.

BHAVANANI, S. M.; BALLOU, C. H. New agents for gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.528-534, 1992.

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

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, n. 181, p. 1199-2000, 1958.

BOEKHOUT, T.; GUÉHO, E. Basidiomycetous Yeasts. In: HOWARD, D. H. **Pathogenic Fungi in Humans and Animals**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2003.

BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. ***Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: ACIAR/CSIRO, 1991.

BONA, C.; BOEGER, M. R.; SANTOS, G. O. **Guia ilustrado de anatomia vegetal**. Ribeirão Preto: Holos, 2004, p.30-31.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R., CRUZ, M. E. S.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e

elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.383-387, 2007.

BRAGA, H. C. **Os óleos essenciais do Brasil, estudo econômico**. Rio de Janeiro: Instituto de Óleos, 1971.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm- Wiss.u.- 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, p.949-951, 1996.

BROOKER, M. I. H.; SLEE, A. V.; CONNORS, J. R.; DUFFY, S. M. **EUCLID-Eucalypts of Southern Australia**. CSIRO, 2002. Disponível em: <<http://www.anbg.gov.au/cpbr/cd-keys/Euclid/sample/html/index.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S.A., 1991.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223–253, 2004.

BUSBY OILS NATAL. **Eucalyptus oil uses**. Disponível em: < www.busbyoils.co.za >. Acesso em: 27 nov. 2009.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.5, 2002.

CHAIIEB, K.; ZMANTAR, T.; KSOURI, R.; HAJLAOUI, H.; MAHDOUANI, K.; ABDELLY, C.; BAKHROUF, A. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. **Mycoses**, v.50, n.5, p.403-406, 2007.

CHOI, H. S.; SONG, H. S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical scavenging activities of *Citrus* essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.4156-4161, 2000.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal

plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.213-220, 2002.

COSTA, A. F. **Farmacognosia experimental**. v.3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972, p.108.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. v.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. p.618-619.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

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

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

DAYAL, R.; AYYAR, K. S. Analysis of medicinal oil from *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* leaves. **Planta Medica**, v.52, n.2, p.162, 1986.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, n.9, p.505-512, 2006.

DITENGOU, F. A.; BÉQUIRISTAIN, T.; LAPEYRIE, F. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. **Planta**, v.211, n.5, p.722-728, 2000.

DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Inkata, 1991. p.11-28.

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.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti- *Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

DUTTA, B. K.; KARMAKAR, S.; NAGLOT, A.; AICH, J. C.; BEGAM, M. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. **Mycoses**, v.50, n.2, p.121-124, 2007.

EGWAIKHIDE, P. A.; OKENIYI, S. O.; AKPORHONOR, E. E.; EMUA, S. O. Studies on bioactive metabolites constituents and antimicrobial evaluation of leaf extracts of *Eucalyptus globulus*. **Agricultural Journal**, v.3, n.1, p.42-45, 2008.

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná**. Curitiba, 1986. 89p. (Documentos, 17)

ENGLER, A. **Syllabus der pflanzenfamilien**. Berlin: Gebruder, 1964.

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.

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

FALAHATI, M.; TABRIZIB, N. O.; JHANIANI, F. Anti dermatophyte activities of *Eucalyptus camaldulensis* in comparison with Griseofulvin. **Iranian Journal of Pharmacology Therapy**, v.4, p.80-83, 2005.

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Eucalypts for planting**. Itália: 1955.

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **El eucalipto en la repoblación forestal**. Roma: 1981.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Atheneu SP Ltda. 4 ed. Parte I. 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Atheneu SP Ltda. Parte IV. 1996.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v.55, n.1, p.123-142, 1968.

FILHO, E. P.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Embrapa Florestas (Colombo-PR), 2006. 45 p. (Documentos, 129)

FINCH, R. G. Antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, n.2, p.125-128, 1998.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. v. Mueller. Ex. Benth, Myrtaceae**. Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

FRANCO, J., NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.191-194, 2005.

GAZIM, Z. C.; REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.1, p.61-63, 2008.

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, n.2, p.731-737, 2010.

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.

GREEN, C. **Export development of essential oils and spices by Cambodia**. Kent: C. L. Green Consultancy Services, 2002.

GRIN Taxonomy. **Accepted homotypic binomials from GRIN to be added to stabilized list**. Disponível em: < <http://www.ars-grin.gov/~sbmljw/istartpt5a.html>>. Acesso em: 15 jul. 2008.

GUENTHER, E. **The Essential Oils** (The constituents of essential oils). 3 ed. New York: Van Nostrand, 1957. v.2.

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.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v.27, n.1, p.1-93, 2006.

HARBORNE, J. B.; DEY, P. M. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997.

HARRIS, R. Synergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, n.4, p.179-186, 2002.

HASEGAWA, T.; TAKANO, F.; TAKATA, T.; NIIYAMA, M.; OHTA, T. Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemistry**, v.69, n.3, p.747-753, 2008.

HE, C.; MURRAY, F.; LYONS, T. Seasonal variations in monoterpene emissions from *Eucalyptus* species. **Chemosphere: Global Change Science**, v.2, p.65-76, 2000.

HERNÁNDEZ, J. M.; MOLE, L. M. L.; RIOS, G. G.; RASIMBAZAFY, J. M.; PEREZ, A. R. Estudio de la composición química Del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* obtenido em Cuba. **Revista Cubana de Farmácia**, v.22, n.1, p.76-85, 1988.

HEYDER, C. D. T.; SILVA, D. A. K. Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. **Revista Saúde e Ambiente**, v.5, n.2, p.7-12, 2004.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HORN, H.; KRANZ, Z.; LAMBERTON, J. The composition of *Eucalyptus* and some other leaf waxes. **Australian Journal of Chemistry**, v.17, p.464-476, 1964.

IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; **SALGADO**, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.387-393, 2008.

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.

JIROVETZ, L.; BAIL, S.; BUCHBAUER, G.; STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; STANCHEV, V.; SCHMIDT, E. Chemical composition, olfactory evaluation and antioxidant effects of the leaf essential oil of *Corymbia citriodora* (Hook) from China. **Natural Product Communications**, v.2, n.5, p.599-606, 2007.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. de. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.632-637, 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, n.3, p.202-212, 1926.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JUERGENS, U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; REPGES, A. G. R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v.97, n.3, p.250-256, 2003.

- KOEHLER, H. S. **Manual simplificado de uso do programa MSTATC**. Curitiba: UFPR/SCA Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 1996.
- KOHLI, R. K.; BATISH, D. R.; SINGH, H. P. Eucalypt oil for the control of parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.). **Crop Protection**, v.17, p.119-122, 1998.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8 ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 5ed. Rio de Janeiro: Nova Era, 2001.
- LAWRENCE, B. M. Progress in essential oils. **Perfumer and Flavorist**, v.22, p.49-51, 1997.
- LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.1573-1579, 2001.
- LI, H.; HAO, Z.; WANG, X.; HUANG, L.; LI, J. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. **Bioresource Technology**, v.100, p.970-974, 2009.
- LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. de. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LOW, D.; RAWAL, B. D.; GRIFFIN, W. J. Antibacterial action of the essential oils of some Australian Myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fractions of oil of *Eucalyptus citriodora*. **Planta Medica**, v.26, p.184-189, 1974.
- MAERTENS, J. A.; BOOGAERTS, M. A. Fungal cell wall inhibitors: emphasis on clinical aspects. **Current Pharmaceutical Design**, v.6, n.2, p.225-239, 2000.
- 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**, v.28, n.5, p.756-761, 2009.
- MALINOWSKI, L. R. L.; NAKASHIMA, T.; WARTH, J. F. G.; PINHEIRO, R. L. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* (Maiden *et al.*) J. B. Kirkpat. (Myrtaceae)**. Pôster apresentado no IV Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, Cuiabá, 2009.

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

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.32, n.5, p.449-460, 2006.

MATKOWSKI, A.; PIOTROWSKA, M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. **Fitoterapia**, v.77, p.346-353, 2006.

McGINNIS, M. R. **Laboratory Handbook of Medical Mycology**. New York: Academic Press, 1980.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. dos; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12 ed. Rahway: Merck, 1996.

METCALFE C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons – leaves, stem, and Wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Londres: Oxford University Press, 1965, p.620-631.

MIYAKE, T.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of natural compounds found in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1819-1822, 1997.

MOHAMED, A. F.; HASAN, A. G. A.; HAMAMY, M. I.; ABDEL-SATTAR, E. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Eucalyptus maculate*. **Medical Science Monitor**, v.11, n.11, p.426-431, 2005.

MOSQUERA, O. M.; CORRERA, Y. M.; NIÑO, J. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.382-387, 2009.

NAKASHIMA, T. **Manual prático de fitoquímica**. Curitiba: Departamento de Farmácia – UFPR, 1993. 25p. (Apostila).

NASCENTE, P. S.; MEINERZ, A. R. M.; FARIA, R. O. de; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. de. Clsi broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.2, p.222-226, 2009.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NISHIMURA, H.; CALVIN, M. Essential Oil of *Eucalyptus globulus* in California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.2, p.432-435, 1979.

OBENG-OFORI, D.; REICHMUTH, C. H.; BEKELE, J.; HASSANALI, A. Biological activity of 1,8 cineole, a major component of essential oil of *Ucimum kenyense* (Ayobangira) against stored product Beetles. **Journal of Applied Entomology**, v.121, n.1, p.237-243, 1997.

OKAMURA, H.; MIMURA, A.; NIWANO, M.; YOKAHARA, Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. **Phytochemistry**, v.33, n.3, p.557-561, 1993.

ÓLEOS essenciais de eucalipto. **Revista da Madeira**, n.75, 2003. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/revista_materia.php?edicao=59&id=19>. Acesso em: 02 jun. 2008.

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

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991, p.78-79.

OSAWA, T.; NAMIKI, M. Natural antioxidants isolated from *Eucalyptus* leaf waxes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, n.5, p.777-780, 1985.

OYEDEJI, A. O.; EKUNDAYO, O.; OLAWORE, O. N.; ADENIYI, B. A.; KOENIG, W. A. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v.70, p.526-528, 1999.

OZKAN, G.; SIMSEK, B.; KULEASAN, H. Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro. **Journal of Food Engineering**, v.79, p.1391-1396, 2007.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbioscience**, v.83, p.39-46, 1997.

PENFOLD, A. R.; WILLIS, J. L. **The Eucalypts - Botany, cultivation, chemistry and utilization**. 1ed. London: Leonard Hill, 1961.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.3, p.624-632, 2007.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C. da; SOUZA, A. B. de; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. de. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v.32, n.2, p.412-416, 2009.

PHARMACOPEA Helvetica. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur. 7 ed. v.4.5.6, 1993.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PODDA, M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, p.578-582, 2001.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

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

QIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University Science**, v.5, n.6, p.676-683, 2004.

RAMALAKSHMI, K.; KUBRA, I. R.; RAO, L. J. M. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. **Food Research International**, v.41, p.96-103, 2008.

RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**, v.73, p.261-262, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REBELO, M. M.; SILVA, J. K. R. da; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p.230-235, 2009.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80-84, 2005.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, p.621-632, 2005.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antimicrobial studies of the constituents of Pakistani eucalypts oils. **Journal of Faculty Pharmacy of Gazi University**, v.12, n.2, p.129-140, 1995.

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

SAMPAIO, A. N. **Os eucaliptos no Brasil**. Aracruz: Aracruz Celulose, 1975.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v.21, n.3, p.231-233, 2007.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SBS Sociedade Brasileira de Silvicultura. **Fatos e números do Brasil Florestal**. 2007. Disponível em: < <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2009.

SCHUMACHER, M. V. Estudo da biomassa e dos nutrientes de um povoamento de *Eucalyptus globulus* (Labillardière) subespécie *bicostata*. **Revista Árvore**, v.22, n.2, p.281-286, 1998.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S. M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.391-397, 2007.

SEYOUM, A.; KILLEEN, G. F.; KABIRU, E. W.; KNOLS, B. G. J.; HASSANALI, A. Field efficacy of thermally expelled or live potted repellent plants against African malaria vectors in western Kenya. **Tropical Medicine and International Health**, v.8, p.1005-1011, 2003.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biociência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SILOU, T.; LOUMOUAMOU, A. N.; LOUKAKOU, E.; CHALCHAT, J. C.; FIGUÉREDO, G. Intra and interspecific variations of yield and chemical composition of essential oils from five *Eucalyptus* species growing in the Congo-Brazzaville. *Corymbia* subgenus. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.203-211, 2009.

SILVA, J. C. Eucalipto: a madeira do futuro. **Revista da Madeira**. Curitiba, setembro, n.59, 114p, 2001.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, n.2-3, p.277-83, 2003.

SILVA, P. H. M. D.; BRITO, J. O.; JUNIOR, F. G. S. Potential of eleven *Eucalyptus* species for the production of essential oils. **Scientia Agricola**, v.63, n.1, 2006.

SILVA, R. B. O.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MATSUMOTO, M. T.; BAEZA, L. C.; BENADUCCI, T.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Genetic diversity and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated of intensive care units patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n.3, p.585-592, 2008.

SILVESTRE, A. J. D.; CAVALEIRO, J. A. S.; DELMOND, B.; FILLIATRE, C.; BOURGEOIS, G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v.6, p.27-33, 1997.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V. F. L.; MOREL, A. F.; POPPI, N. R.; JÚNIOR, J. L. R.; STUKER, C. Z.; PERUZZO, G. M.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.5, p.879-885, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.3, p.123-130, 2003.

SINGH, H. P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of *Eucalyptus tereticornis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.6962-6966, 2009.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

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

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESHI, T.; PERUMALSAMY, P. L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.217-220, 2001.

STAHL, E. **Thin – Layer Chromatography- A Laboratory Handbook**. New York: Springer - Verlag Berlin - Heidelberg, 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.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.1, p.60-64, 2004.

TANTAWY, M. E. Morpho- anatomical study on certain taxa of Myrtaceae. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.3, n.3, p.274-283, 2004.

TOLOZA, A. C.; LUCIA, A.; ZERBA, E.; MASUH, H.; PICOLLO, M. I. Interspecific hybridization of *Eucalyptus* as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina. **Bioresource Technology**, v.99, n.15, p.7341-7347, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

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 anatômicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalyptus 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. Anatomia e histoquímica foliar de sete espécies de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.32, n.4, p.769-779, 2008b.

UNITED States Department of Agriculture (Natural Resources Conservation Service). **Classification for kingdom Plantae down to subspecies *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *maidenii* (F. Muell.) J. B. Kirkpat.** Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=EUGL2>>. Acesso em: 07 jan. 2009.

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.

VILELA, G. R.; ALMEIDA, G. S. de; D'ARCE, M. A. B. R.; MORAES, M. H. D.; BRITO, J. O.; SILVA, M. F. G. F.; SILVA, S. C.; PIEDADE, S. M. S.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLORIA, E. M. da. Activity of essential oil and its major compound, 1,8- cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. **Journal of Stored Products Research**, v.45, n.2, p.108-111, 2009.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. 2003. (Documentos Florestais, 17)

VITURRO, C. I.; MOLINA, A. C.; HEIT, C. I. Volatile components of *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* from Jujuy, Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, n.3, p.206-208, 2003.

YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **Journal of Dermatological Science**, v.27, suplement.1, p.S1-S4, 2001.

YANG, Y. C.; CHOI, H. Y.; CHOI, W. S.; CLARK, J. M.; AHN, Y. J. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.2507-2511, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Drogenanalyse**. Berlin: Springer, 1983.

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.

WHO World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.

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

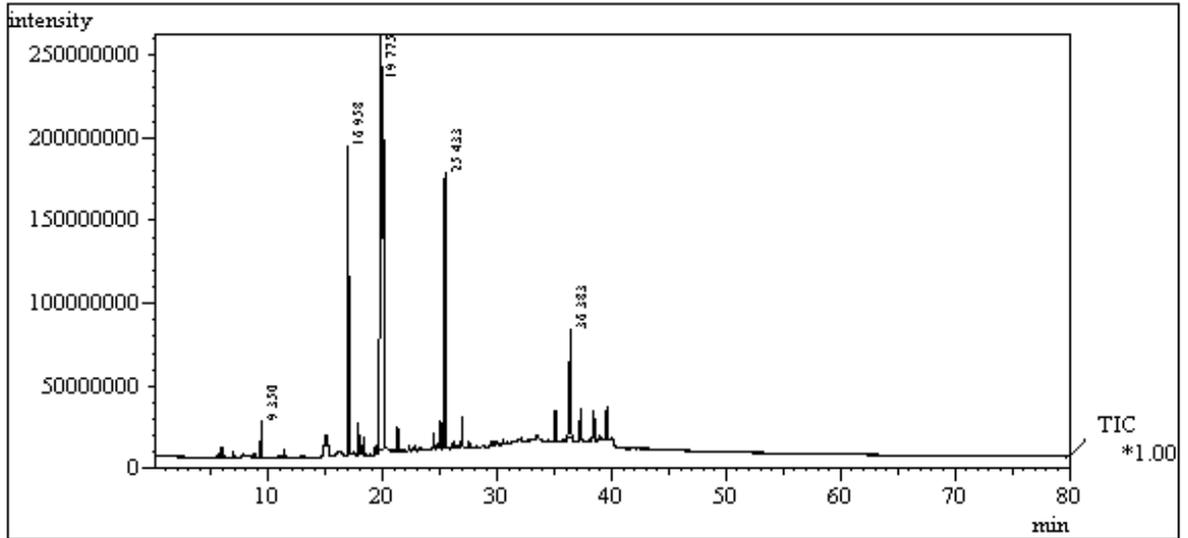
WILDY, D. T.; PATE, J. S.; BARTLE, J. R. Variations in composition and yield of leaf from alley-farmed oil mallee (*Eucalyptus* spp.) at a range of contrasting sites in the Western Australian wheatbelt. **Forest Ecology and Management**, v.134, n.1-3, p.205-217, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

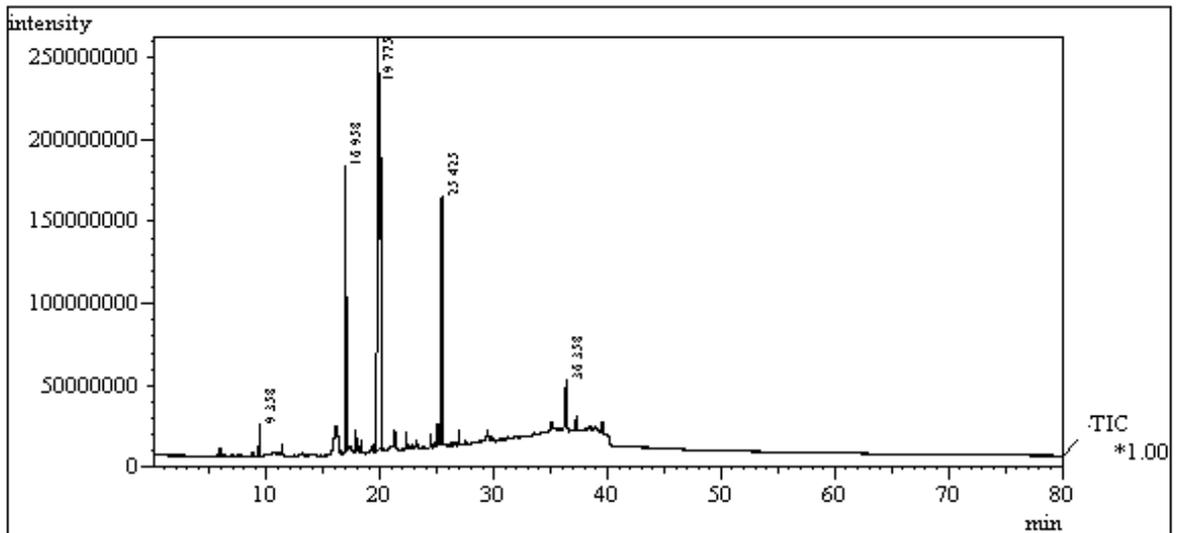
ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; DINIS, A. M.; CANHOTO, J. M.; SALGUEIRO, L. R. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula pedunculata* (Miller) Cav. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.8, p.1283-1292, 2009.

APÊNDICES

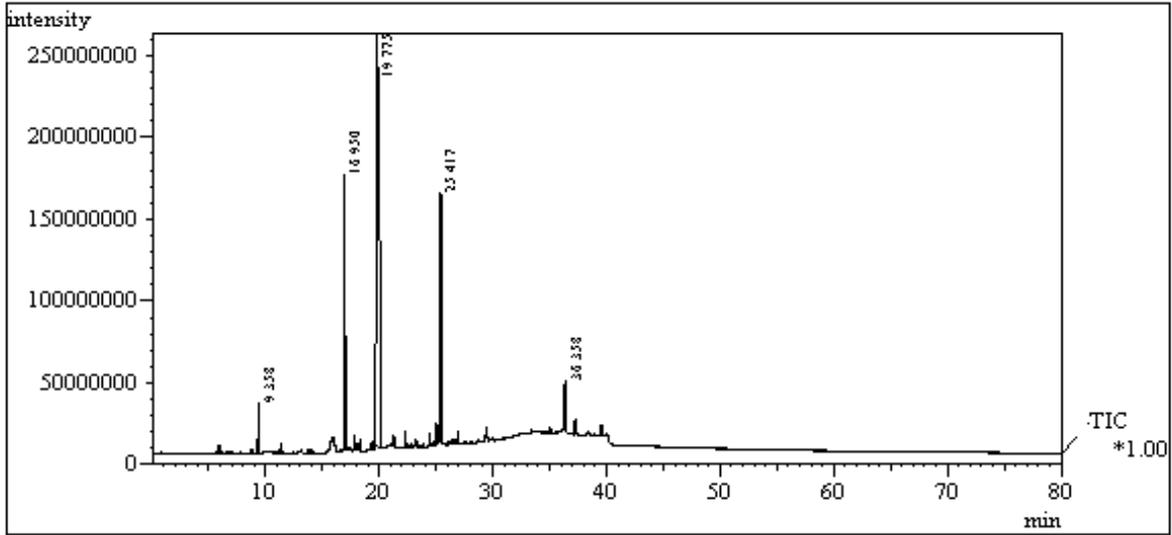
APÊNDICE 1 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DA COLETA DE PRIMAVERA



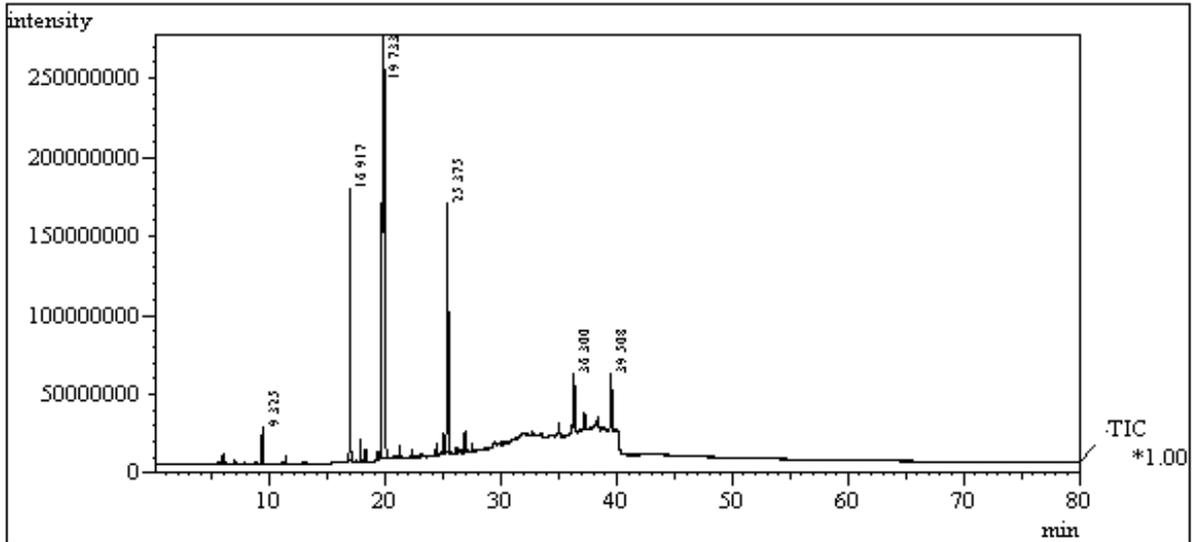
APÊNDICE 2 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DA COLETA DE VERÃO



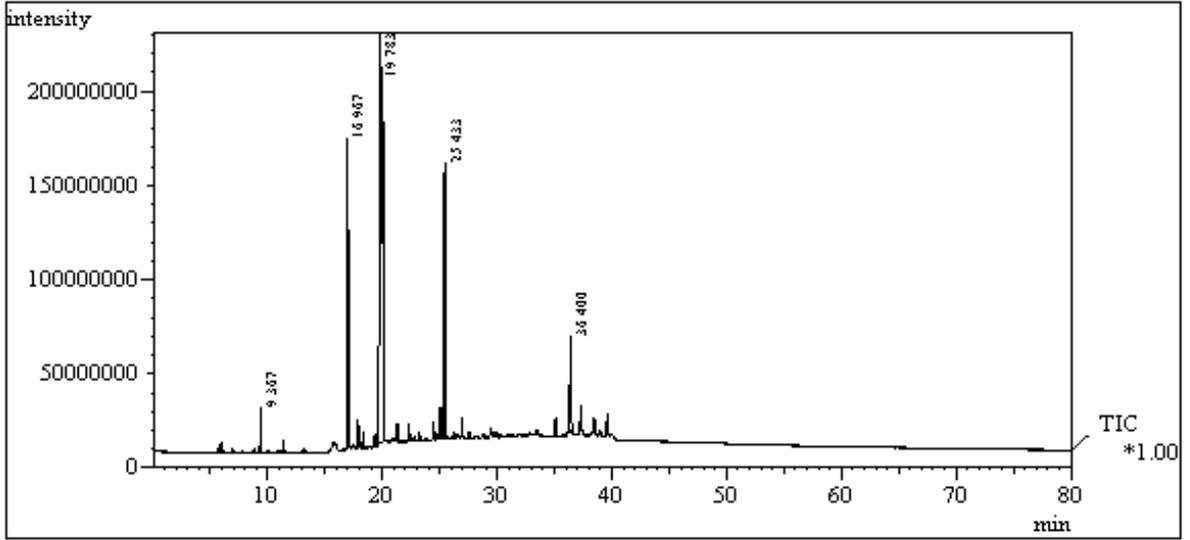
APÊNDICE 3 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DA COLETA DE OUTONO



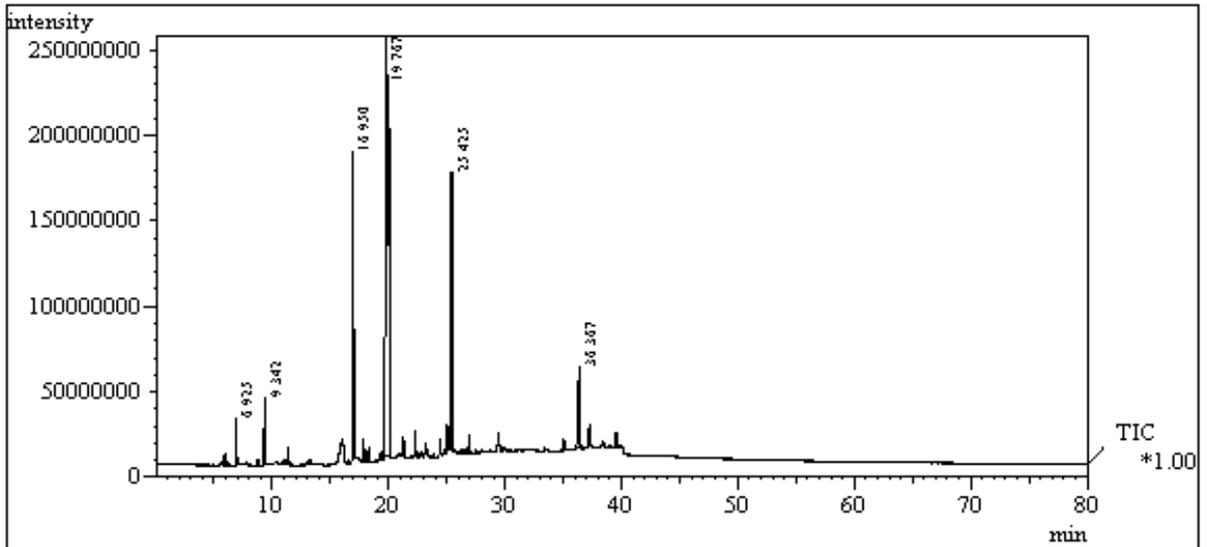
APÊNDICE 4 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS FRESCAS DA COLETA DE INVERNO



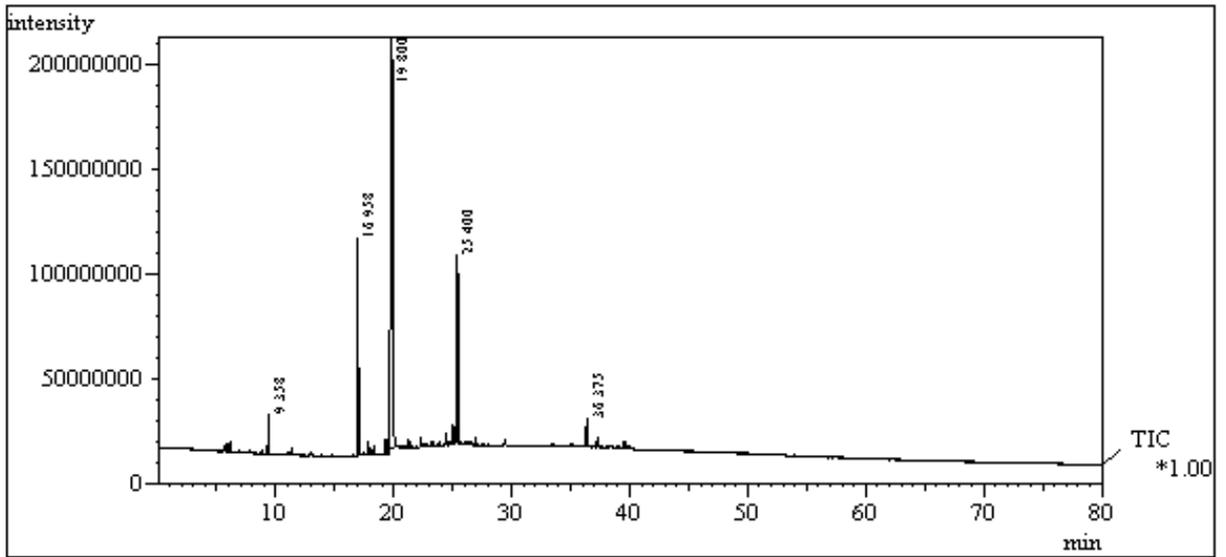
APÊNDICE 5 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DA COLETA DE PRIMAVERA



APÊNDICE 6 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DA COLETA DE VERÃO



APÊNDICE 7 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DA COLETA DE OUTONO



APÊNDICE 8 – CG DA AMOSTRA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DA COLETA DE INVERNO

