

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LORENE ARMSTRONG

**ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMESS., MYRTACEAE**

CURITIBA
2011

LORENE ARMSTRONG

**ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia do Rocio Duarte
Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA
2011

Armstrong, Lorene
Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae./ Lorene Armstrong
Curitiba, 2011.
120 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Márcia do Rocio Duarte
Co-Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de insumos, medicamentos e correlatos.

Referências bibliográficas: f. 108-120

1. *Eugenia pyriformis*. 2. Myrtaceae. 3. Morfoanatomia. 4. Triterpenos. 5. Derivados porfirínicos. I. Duarte, Márcia do Rocio. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

A Deus, que iluminou os meus passos.
Aos meus pais Raquel Armstrong e Swamy Armstrong (*in
memorian*).
Aos meus avós.
Aos amigos que estão sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado inúmeras coisas especiais e guiado meu caminho, nos bons e maus momentos, e por me fazer persistir sempre.

À minha mãe, ao meu pai (*in memoriam*), aos meus irmãos e meus avós que sempre foram fundamentais em toda minha vida, sempre me dando apoio, incentivo, compreensão, auxílio e por me fazerem feliz.

Agradeço à minha orientadora Márcia Duarte pelo grande aprendizado que me proporcionou, pelas contribuições no meu trabalho, pelos ensinamentos, pelos incentivos e apoio que me deu durante este trabalho.

Ao meu co-orientador Obdulio Gomes Miguel pelos ensinamentos, pela amizade, companheirismo, paciência e confiança.

Ao botânico Gert Hatschbach e biólogo Osmar do S. Ribas e funcionários do Museu Botânico Municipal pelas informações, coleta, identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

Ao Nilson, do Laboratório de Botânica, pela ajuda na preparação das lâminas permanentes.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio no processamento do material para realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Angela, microbiologista do Hospital de Clínicas pela realização das atividades das amostras.

À Facoltà di Farmacia di Novara-Itália pela oportunidade de realizar o mestrado-sanduiche, possibilitando a realização de um sonho.

Ao Professor Giovanni Appendino, Federica Pollastro e todos os meus colegas, pelo acolhimento, por todos os ensinamentos, pela oportunidade que me deram e pela amizade.

À Grazielli do Departamento de Química, pela realização dos espectros de infravermelho.

À doutoranda Cristina Peitz, ao doutorando Leopoldo e à Professora Ana Lordello, pela ajuda na complementação e estudo dos espectros.

Ao professor Cid Aimbiré pelo apoio, pelas informações, ajuda e por ter me dado um contato muito importante para realização do intercâmbio.

À professora Marilis Dallarmi Miguel pelo apoio e auxílio na concretização do meu sonho.

A todos os meus colegas e amigos de mestrado, em especial dos Laboratórios de Fitoquímica e Farmacognosia pelo companheirismo, amizade e auxílio em tudo que precisei desde o início.

Aos meus amigos de longa data, por sempre estarem presentes, dando apoio, estímulo, conforto e compreensão.

RESUMO

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess., conhecida popularmente como uvaia, é uma Myrtaceae nativa do Brasil. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de gota, pois possui a propriedade de baixar os níveis de ácido úrico. Este trabalho teve como objetivo realizar estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule da espécie, acrescentando dados ao conhecimento dessa planta medicinal e potencial droga vegetal. O material vegetal foi coletado, identificado e devidamente preparado para as diferentes análises. Quanto à morfoanatomia, observou-se que a folha é simples, oposta e elíptico-lanceolada. Possui epiderme uniestratificada, estômatos anomocíticos restritos à face abaxial, tricomas tectores unicelulares, mesofilo dorsiventral e nervura central com secção plano-convexa, com um feixe vascular bicolateral. No caule, o felogênio tem instalação superficial e há floema interno, fibras e células pétreas. Compostos fenólicos, prismas e drusas de oxalato de cálcio ocorrem nos órgãos vegetativos analisados. Na prospecção fitoquímica, verificaram-se glicosídeos flavônicos e esteroides e/ou triterpenoides no extrato hidroalcoólico de folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos foram detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule. No óleo essencial, foram encontrados os monoterpênos oxigenados 1,8-cineol, linalol e terpinen-4-ol. Três substâncias foram identificadas e relatadas pela primeira vez na espécie, o triterpeno β -amirina e os derivados porfirínicos feofitina *a* e feofitina *b*. Com relação à atividade antioxidante no ensaio com DPPH, constatou-se que a fração de acetato de etila de folha possui atividade antioxidante maior em relação às demais. Para o complexo fosfomolibdênio, o extrato etanólico bruto de folha e caule, e a fração de acetato de etila de folha têm atividade antioxidante um pouco superior à da rutina. Com referência à ação antimicrobiana, demonstrou-se que o extrato etanólico bruto de folha apresenta atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e as frações de acetato de etila e hidroalcoólica de folha apresentam efeito inibitório frente a *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*. Esses três microrganismos sofreram inibição de crescimento pelo extrato etanólico bruto de caule. O extrato acetônico bruto de folha e caule revelou atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *E. faecalis*. No teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, verificou-se que as frações clorofórmica e de acetato de etila de folha e as frações hexânica, de acetato de etila e hidroalcoólica de caule apresentam citotoxicidade com DL₅₀ inferiores a 1000 µg/mL. No teste alelopático, as amostras não mostraram influência sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa*, exceto a fração hexânica de caule que inibiu o crescimento da radícula em proporção maior. Os resultados obtidos contribuíram para acrescentar dados ao conhecimento botânico, fitoquímico e de atividades biológicas dessa espécie medicinal.

Palavras-chave: *Eugenia pyriformis*, Myrtaceae, morfoanatomia, triterpenos, derivados porfirínicos.

ABSTRACT

Eugenia pyriformis Cambess., known as uvaia in Portuguese, is a Myrtaceae species native to Brazil. Its leaves are used in folk medicine for the treatment of gout, due to the property of lowering the uric acid levels. This work has aimed to study the morpho-anatomy, phytochemistry and biological activities of the leaf and stem of *E. pyriformis*, adding datato knowlege to this medicinal plant and potential vegetal drug. The plant material was collected, identified and properly prepared for the different analyses. With respect to the morpho-anatomy, it was observed that the leaf is simple, opposite and elliptic-lanceolate. It has uniseriate epidermis, anomocytic stomata exclusively on the abaxial surface, unicellular non-glandular trichomes, dorsiventral mesophyll and plano-convex midrib with a bicollateral vascular bundle. In the stem, the phellogen is installed superficially and it is found internal phloem, fibres and stone cells. Phenolic compounds, prisms and druses of calcium oxalate are present in the vegetative parts examined. In the phytochemical screening, it was found flavonoid glycosides and steroids and/or triterpenoids in the leaf hydroalcoholic extract, while saponins, tannins and fixed acids were detected in the leaf and stem aqueous extracts. In the essential oil, it was encountered the oxygenated monoterpenes 1,8-cineole, linalool and terpinen-4-ol. Three substances were identified and reported for the first time for the species, the triterpene β -amyrin and the porphyrin derivatives pheophytin *a* and pheophytin *b*. Related to the antioxidant activity with DPPH essay, the ethyl acetate fraction of the leaf has presented higher antioxidant activity than the other samples. Regarding the phosphomolybdenum complex, the crude ethanol extract of the leaf and stem, and the ethyl acetate fraction of the leaf have shown a little higher effect than rutin. Considering the antimicrobial activity, the crude ethanol extract of the leaf inhibits *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and the ethyl acetate and hydroalcoholic fractions of the leaf exhibit effect against *S. aureus* and *Enterococcus faecalis*. These three microorganisms have undertaken growth inhibition by the crude ethanol extract of the stem. The crude acetone extract of the leaf and stem has shown activity against *Pseudomonas aeruginosa* e *E. faecalis*. In the *Artemia salina* toxicity essay, it was observed that the chloroform and ethyl acetate fractions of the leaf and the hexane, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions of the stem have cytotoxicity with LD₅₀ less than 1000 μ g/mL. Considering the allelopathic test, the samples have not influenced the growth of the *Lactuca sativa* seeds, except for the hexane fraction of the stem which inhibits the root growth in higher proportion. The results of this work have contributed to expand the knowledge on the botanical, phytochemical and biological activities of this medicinal species.

Keywords: *Eugenia pyriformis*, Myrtaceae, morpho-anatomy, triterpenes, porphyrin derivatives.

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1. CURVA PADRÃO DA VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH... 90
- GRÁFICO 2. CURVA PADRÃO DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH..... 90
- GRÁFICO 3. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE PELA REDUÇÃO DO DPPH..... 91
- GRÁFICO 4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO DPPH DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E À RUTINA..... 91
- GRÁFICO 5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, E DA RUTINA COMPARADA À VITAMINA C..... 94
- GRÁFICO 6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DO CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* (PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO CONTROLE ETANOL X DOSES DA AMOSTRA EM mg)..... 104

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. ASPECTO GERAL NO HABITAT..... 26
- FIGURA 2. FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS COM FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS.,MYRTACEAE..... 38
- FIGURA 3. COLUNA CROMATOGRÁFICA DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DO EXTRATO ACETÔNICO, PROVENIENTES DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE..... 39
- FIGURAS 4-9. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE: 4. RAMO VEGETATIVO APICAL; 5. FOLHAS SIMPLES, FACES ADAXIAL E ABAXIAL; 6. FACE ADAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 7. FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 8. TRICOMA TECTOR NA FACE ADAXIAL DA EPIDERME FOLIAR; 9. NUMEROSOS TRICOMAS TECTORES NA FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR..... 42
- FIGURAS 10-15. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FOLHA: 10,11. TRICOMAS TECTORES E ESTÔMATOS NA FACE ABAXIAL DA EPIDERME; 12. SECÇÃO TRANSVERSAL DO LIMBO; 13. SECÇÃO TRANSVERSAL DA REGIÃO INTERNERVURAL, INDICANDO FEIXE VASCULAR DE PEQUENO PORTE; 14. SECÇÃO TRANSVERSAL DA REGIÃO INTERNERVURAL, MOSTRANDO MESOFILO DORSIVENTRAL E CAVIDADE SECRETORA; 15. DETALHE DE UMA CAVIDADE SECRETORA..... 43
- FIGURAS 16-19. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FOLHA, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 16. PORMENOR DE UM ESTÔMATO NA FACE ABAXIAL E PRISMA DE OXALATO DE CÁLCIO; 17. FEIXE VASCULAR BICOLATERAL DA NERVURA CENTRAL; 18. DETALHE DA NERVURA CENTRAL, JUNTO À FACE ADAXIAL, MOSTRANDO PARTE DA BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA E DO FLOEMA INTERNO; 19. NERVURA CENTRAL, JUNTO À FACE ABAXIAL, EM QUE SE INDICAM XILEMA E FLOEMA EXTERNO.... 44
- FIGURAS 20-24. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FOLHA, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 20. PRISMA DE OXALATO DE CÁLCIO; 21, 22. ASPECTO GERAL DO PECÍOLO; 23. FEIXE VASCULAR BICOLATERAL DO PECÍOLO; 24. PORMENOR DO FEIXE VASCULAR DO PECÍOLO..... 45
- FIGURAS 25-27. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE: 25, 26. ORGANIZAÇÃO GERAL; 27. PERIDERME, CÓRTEX E CILINDRO VASCULAR..... 46

FIGURAS 28-30. <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS., MYRTACEAE. CAULE, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 28. DETALHE DE SÚBER, CÓRTEX, FLOEMA EXTERNO E XILEMA; 29. XILEMA, FLOEMA INTERNO E MEDULA; 30. PORMENOR DE FIBRAS E PRISMAS NA MEDULA.....	47
FIGURA 31. CROMATOGRAMA ANALISADO POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHA DE <i>Eugenia pyriformis</i> , CAMBESS., MYRTACEAE.....	53
FIGURA 32. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO LA4D OBTIDO DA FRAÇÃO METANÓLICA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS., MYRTACEAE.....	56
FIGURA 33. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO COMPOSTO LA4D ISOLADO DA FRAÇÃO METANÓLICA, PROVENIENTE DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS., MYRTACEAE. FASE MÓVEL: PetOAc 8:2.....	57
FIGURA 34. ESPECTRO DE RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA4D.....	59
FIGURA 35. EXPANSÃO DA REGIÃO DE δ 3,0 DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA4D.....	59
FIGURA 36. EXPANSÃO DA REGIÃO DE δ 5,0 DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA4D.....	60
FIGURA 37. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) DE LA4D.....	60
FIGURA 38. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) NA REGIÃO DE δ15 A 50 ppm DE LA4D.....	61
FIGURA 39. ESPECTRO DE RMN DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA4D....	62
FIGURA 40. EXPANSÃO DE RMN DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA4D (δ E ppm), REGIÃO DE δ15 A 50 ppm.....	63
FIGURA 41. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO LA6A OBTIDO DA FRAÇÃO ACETÔNICA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS., MYRTACEAE.....	64
FIGURA 42. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO LA7A OBTIDO DA FRAÇÃO ACETÔNICA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS., MYRTACEAE.....	65
FIGURA 43. ESPECTRO GERAL DE RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA6A (δ E	

ppm).....	70
FIGURA 44. ESPECTRO GERAL DE RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) DE LA6A (δ E ppm).....	71
FIGURA 45. EXPANSÃO DA REGIÃO (3,22 A 4,54 ppm) DO ESPECTRO DE RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA6A.....	72
FIGURA 46. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) DE LA6A.....	73
FIGURA 47. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) NA REGIÃO DE δ 90-200 PPM DE LA6A.....	74
FIGURA 48. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) NA REGIÃO DE δ 10-70 PPM DE LA6A.....	75
FIGURA 49. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA6A.....	76
FIGURA 50. EXPANSÃO DE RMN DE ¹³ C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA6A, REGIÃO ATÉ 130 ppm.....	77
FIGURA 51. ESPECTRO GERAL DE RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA7A (δ E ppm).....	80
FIGURA 52. ESPECTRO GERAL DE RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) DE LA7A (δ E ppm).....	81
FIGURA 53. EXPANSÃO DA REGIÃO δ 8-11 DO ESPECTRO DE RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) DE LA7A.....	82
FIGURA 54. ESPECTRO GERAL DE RMN- ¹³ C (52 MHz, CDCl ₃) DE LA7A (δ E ppm).....	83
FIGURA 55. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) NA REGIÃO DE δ 90-200 ppm DE LA7A.....	84
FIGURA 56. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) NA REGIÃO DE δ 10-70 ppm DE LA7A.....	85
FIGURA 57. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA7A.....	86
FIGURA 58. EXPANSÃO DE RMN DE ¹³ C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA7A, REGIÃO DE δ 10-50 ppm.....	87
FIGURA 59. EXPANSÃO DE RMN DE ¹³ C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl ₃) DE LA7A, REGIÃO DE δ 50-200 ppm.....	88

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA E DE ACETATO DE ETILA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE..... 52
- QUADRO 2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE..... 52

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. DETERMINAÇÃO DE CINZAS E RESÍDUO SÓLIDO DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE..... 51
- TABELA 2. COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE..... 54
- TABELA 3. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹³C E DEPT DE LA4D EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA A β-AMIRINA..... 58
- TABELA 4. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹³ C E DEPT DE LA6A E LA7A EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA FEOFITINA a E b..... 66
- TABELA 5. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹H DE LA6A EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA FEOFITINA a..... 67
- TABELA 6. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹H DE LA7A EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA FEOFITINA b..... 67
- TABELA 7. DETERMINAÇÃO DE IC₅₀ E CLASSIFICAÇÃO DE TUKEY PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO DPPH DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE..... 89
- TABELA 8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E À RUTINA..... 94
- TABELA 9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Enterococcus faecalis*..... 96
- TABELA 10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO E DOS COMPOSTOS ISOLADOS LA4D E LA6A, OBTIDOS DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia*

pyrifomis CAMBESS., MYRTACEAE, FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Enterococcus faecalis*..... 96

- TABELA 11. MORTALIDADE E ÍNDICE DE MORTALIDADE DE *Artemia salin* AVALIADOS FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E ÀS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyrifomis* CAMBESS MYRTACEAE..... 99
- TABELA 12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA DE *Eugenia pyrifomis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*..... 100
- TABELA 13. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE CAULE DE *Eugenia pyrifomis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*..... 101
- TABELA 14. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA DE *Eugenia pyrifomis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*..... 102
- TABELA 15. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE CAULE DE *Eugenia pyrifomis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS

α	alfa
β	beta
γ	gama
μg	micrograma
μL	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
BM	banho-maria
CIM	concentração inibitória mínima
DL_{50}	dose letal média
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
F. Bras.	Farmacopeia Brasileira
GL	Gay-Lussac
g	grama
h	hora
IC_{50}	concentração inibitória média
IV	infravermelho
IVG	índice de velocidade de germinação
m	metro
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanômetro

pH	potencial hidrogeniônico
RMN	ressonância magnética nuclear
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 OBJETIVO GERAL.....	20
1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE.....	21
2.2 GÊNERO <i>Eugenia</i>	23
2.3 ESPÉCIE <i>Eugenia pyriformis</i> CAMBESS.	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	27
3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	27
3.2.1 Lâminas semipermanentes.....	27
3.2.2 Lâminas permanentes.....	27
3.2.3 Testes microquímicos.....	28
3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	28
3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	28
3.3.1 Cinzas totais.....	29
3.3.2 Resíduo sólido e prospecção fitoquímica.....	20
3.3.3 Isolamento e Identificação de compostos químicos.....	32
3.3.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	33
3.4 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	35
3.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
3.4.2 Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	36
3.4.3 Avaliação da atividade alelopática.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	40
4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	51
4.2.1 Determinação do teor de cinzas e resíduo sólido da amostra vegetal.....	51
4.2.2 Prospecção fitoquímica.....	51
4.2.3 Identificação de componentes químicos do óleo essencial.....	53
4.2.4 Isolamento e identificação de compostos químicos.....	55
4.2.5 Atividade antioxidante pela redução do radical DPPH.....	89
4.2.6 Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio.....	93

4.3 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	95
4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	95
4.3.2 Avaliação da toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	98
4.3.3 Avaliação da atividade alelopática.....	100
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

A Farmacognosia estuda as matérias-primas naturais e de uso medicinal, e descreve a droga medicinal, vegetal e animal, sob diversos pontos de vista, tais como: origem, história, aspectos macroscópico e microscópico, armazenamento, produção e qualidade, composição química, pesquisa de falsificações, atividade farmacológica, propriedades, emprego e transformação. A pesquisa por novas plantas medicinais busca o isolamento e a identificação de princípios ativos, avaliando sua toxicidade, e procurando melhorar os processos de análise, assim contribuindo para os avanços científicos e econômicos (DEZANI; GUIDETTI, 1953; BRUNETON, 1991; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; COSTA, 2002).

Com a contribuição da Botânica, descrevem-se os caracteres das plantas e dos órgãos utilizados, bem como a localização de seus princípios ativos e secreções, por meio de estudos macroscópicos, microscópicos e histoquímicos (COSTA, 2002). A Fitoquímica contribui para a descoberta de novas estruturas de metabólitos secundários e de suas funções nos vegetais, e explica-os com mecanismos de biossíntese. Está em integração com a química medicinal e a farmacologia, para poder comprovar os princípios ativos existentes e utilizados pela população sem nenhum controle (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; LORENZI; MATOS, 2002).

Compostos químicos obtidos de organismos vivos, que exercem efeitos biológicos em outros organismos, são chamados de produtos naturais bioativos. Estes possuem atividades terapêuticas contra doenças em humanos e animais, sendo indispensável o estudo das plantas para identificar os compostos e avaliar as atividades e os mecanismos de ação dos mesmos. O isolamento de produtos naturais com atividade biológica apresenta inúmeras vantagens, como a identificação das estruturas, que permite a produção de material sintético, a incorporação de modificações estruturais e a racionalização dos mecanismos de ação (COLEGATE; MOLYNEUX, 2008).

O Brasil é um país com imensa riqueza vegetal e muitos representantes da flora não foram estudados, o que desperta interesse também por parte de outros países. O mundo está em busca de opções saudáveis de vida, como alimentação natural, diminuição da poluição e descoberta da cura de novas doenças por meio dos componentes das plantas. Isso faz com que surjam cada vez mais linhas de

pesquisa em universidades, para validação do estudo científico das plantas medicinais, gerando um grande interesse pela fitoterapia (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

A família Myrtaceae é relevante em Farmacognosia, pois muitas das espécies estudadas possuem propriedades terapêuticas, como por exemplo *Eugenia uniflora* L. (pitanga), empregada na medicina popular para controle da hipertensão, diminuição de colesterol e ácido úrico e, também, como adstringente e digestivo, e *E. moraviana* O. Berg (cambuí), que possui compostos que têm atraído atenção pelo seu potencial no tratamento de HIV, tumores, malária e processos inflamatórios (LUNARDI *et al.*, 2001). As folhas de *E. dysenterica* DC. (cagaita) possuem propriedades antidiarreicas e cardiotônicas, e são utilizadas no diabetes e em icterícia (BRANDÃO, 1991; SILVA, 1999). As folhas da espécie *E. brasiliensis* Lam. (grumixama) são utilizadas popularmente como diurético, para artrite e reumatismo, e as de *E. beauveriaana* (Kiaerskou) Legrand são indicadas no tratamento de úlceras, como anti-inflamatório e adstringente (REVILLA, 2002). As folhas de *E. uniflora* e de *E. pyriformis* Cambess. (uvaia) atuam no tratamento da gota humana (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987; THEODULOZ *et al.*, 1988).

Diante da importância do táxon, este trabalho investigou *E. pyriformis* sob diversos aspectos, devido aos escassos estudos realizados até o presente, com a finalidade de acrescentar dados ao conhecimento da flora brasileira e dessa planta medicinal e potencial droga vegetal.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae.

1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfoanatomia (macro e microscopia);
- Determinar parâmetros farmacognósticos: cinzas totais e resíduo sólido;
- Realizar prospecção fitoquímica;
- Isolar e identificar os componentes químicos majoritários do óleo essencial de folha;
- Isolar e identificar as substâncias químicas das frações metanólica e acetônica obtidas do extrato acetônico bruto;
- Determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações de diferentes polaridades (hexânica, clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica);
- Pesquisar as atividades biológicas do extrato etanólico bruto e das frações: ação antimicrobiana, toxicidade frente a *Artemia salina* e atividade alelopática; e
- Pesquisar a ação antimicrobiana do extrato acetônico bruto e dos compostos isolados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae Juss. pertence à ordem Myrtales Rchb., ao grupo das Rosídeas Takht., Eudicotilédoneas Centrais ou Nucleares e Angiospermas (APG II, 2003). Consiste em torno de 130 gêneros e 4000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), sendo seus maiores centros de dispersão a América e a Oceania (JOLY, 1998). Na flora brasileira é uma das maiores famílias, com cerca de 23 gêneros e 1000 espécies, distribuindo-se pelo país inteiro, aparecendo na Floresta Atlântica e Floresta de Restinga. Os gêneros com maior número de espécies são *Eugenia* L., *Marlierea* Cambess. e *Gomidesia* O. Berg (SOUZA; LORENZI, 2005).

As Myrtaceae brasileiras possuem a característica marcante de, a cada estação de crescimento, seu tronco de casca lisa se renovar separando-se todo o ritidoma (JOLY, 1998). Outra característica importante da família é a presença de cavidades secretoras de óleo, que aparecem nas folhas como pontos transparentes, sendo observadas na maioria dos gêneros (METCALFE; CHALK, 1950; SOUZA; LORENZI, 2005).

São árvores ou arbustos lenhosos que têm folhas inteiras, peninérveas, de disposição alterna (gêneros não nativos) ou oposta, de margens inteiras e coloração sempre verde, com estípulas muito pequenas e pontos translúcidos (cavidades secretoras) (JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2005).

As inflorescências são normalmente cimosas, de vez em quando reduzidas a uma única flor. Florescendo no início da primavera, as flores são vistosas de cor branca ou vermelha, efêmeras, hermafroditas, geralmente pentâmeras, mono ou diclamídeas e actinomorfas. O fruto é do tipo baga, drupa, cápsula ou núcula. As sementes apresentam poliembrionia e também podem ser aladas (JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2005).

A família é rica em espécies frutíferas, como jabuticaba (*Myrciaria* spp.), pitanga (*Eugenia uniflora* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.), araçá (*Psidium cattleianum* Sabine), cereja-nacional (*Eugenia retusa* (O. Berg) Nied.), guabiroba (*Campomanesia* spp.) e uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.), entre outras.

Culturas provenientes de outros países também estão ganhando destaque no Brasil, como de *Eucalyptus* spp., que tem grande utilização na obtenção de madeira,

como planta aromática e para fabricação de produtos de limpeza. Outro exemplo é o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), que é utilizado como especiaria, e também o jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), cujo fruto comestível é comum no litoral nordestino. Óleos essenciais são destilados de flores e folhas de vários membros da família (METCALFE; CHALK, 1950; JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2005).

Muitos representantes possuem grande utilidade como plantas medicinais e amplo uso popular (SOUZA; LORENZI, 2005). Algumas espécies de Myrtaceae no Paraguai e na Argentina constituem o complexo Ñangapary, utilizado popularmente como diurético, anti-hipertensivo, adstringente, digestivo, para baixar o colesterol e ácido úrico e diminuir o peso (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.* 1987; LORCA; AMAT; GONZÁLEZ, 1995).

Do ponto de vista da composição fitoquímica na família encontra-se grande quantidade de taninos, enquanto os alcaloides e glicosídeos, com raras exceções, são pouco conhecidos (FONT QUER, 1988).

2.2 GÊNERO *Eugenia*

O gênero *Eugenia* L. é importante na família Myrtaceae, pois apresenta valor nutritivo, farmacológico e comercial (DONADIO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003). Produz frutos com poucas sementes, o que está levando pesquisadores a buscar novas formas de aumentar o potencial de produção de mudas e realizar testes germinativos. O comportamento germinativo de sementes de três espécies de *Eugenia*, *E. involucrata* DC. (cereja), *E. uniflora* L. (pitanga) e *E. brasiliensis* Lam. (grumixama) foi realizado e concluiu-se que essas espécies têm alta capacidade de produção de mudas e de regeneração quando submetidas a algum dano, além de alto potencial na propagação de mudas *in vitro* (SILVA *et al.*, 2003).

Estudos realizados com outras espécies do gênero revelaram propriedades farmacológicas, como *E. brasiliensis*, que em suas folhas e cascas possui propriedades adstringente, antirreumática e diurética, e seu óleo essencial demonstra atividade contra *Trypanosoma cruzi* (FERNANDEZ-FERREIRA *et al.*, 1997).

Eugenia uniflora apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana. A primeira pode ter contribuição da presença dos flavonoides e a segunda tem ação inibitória frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella cholerasuis* e *Pseudomonas aeruginosa* (AURICCHIO *et al.*, 2007). Essa espécie, em estudo realizado por Schmeda-Hirschmann *et al.* (1987), revelou a propriedade de baixar os níveis de ácido úrico.

Flavonoides estão presentes em folhas de espécies de *Eugenia*, tendo sido observados em prospecções fitoquímicas em *E. uniflora* (AURICCHIO; BACCHI, 2003), *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand, *E. umbelliflora* O. Berg (MAGINA *et al.*, 2010) e *E. dysenterica* DC. (COUTO *et al.*, 2009)

Derivados de flavonoides polioxygenados foram identificados em estudos de *E. edulis* Vell., como gossipetina-3,8-dimetil-éter-5-O-*b*-glucosídeo; gossipetina-3,5-dimetil-éter e miricetina-3,5,30-trimetil-éter (HUSSEIN *et al.*, 2003). Nas folhas de *E. jabolana* Lam. foram isolados os flavonoides 3-O-(4"-O-acetil)- α -L-ramnopiranosídeo de miricetina-4'-metil-éter e miricetina-3-O-(4"-O-acetil-2"-O-galoil)- α -L-ramnopiranosídeo (MAHMOUD *et al.*, 2001).

Com relação a terpenoides, em folha e caule de *E. moraviana* O. Berg foram isolados o ácido betulínico, o ácido 6- α -hidroxibetulínico, o ácido platânico e o β -sitosterol (LUNARDI *et al.* 2001). Em *E. brasiliensis* foi identificado o ácido ursólico

(FRIGHETTO *et al.*, 2005). Da folha de *E. florida* DC. foi identificado um triterpeno chamado de *nor-lupânico*, sendo sua estrutura denominada 29-hidroxiplatan-28-ato de β -D-glicosila (JUNGES *et al.*, 1999).

2.3 *Eugenia pyriformis* CAMBESS.

A espécie *Eugenia pyriformis* Cambess. (FIGURA 1) é popularmente conhecida como uvaia, uvaieira, uvaia-do-campo, uvalha e uvalha-do-campo. Ocorre na Argentina, no Paraguai e no Brasil, desde São Paulo até o Rio Grande do Sul (LEGRAND; KLEIN, 1969).

A árvore possui de 5 a 15 m de altura, com copa arredondada, ramos com folhas simples, subcoriáceas e com a face inferior bem seríceas, com característica velutina que revela um brilho particular. Suas flores são solitárias, axilares, pedunculadas e de cor branca. Florescem em novembro, dezembro e janeiro. Seu fruto é globoso e possui aproximadamente 2 cm de diâmetro, aspecto aveludado e polpa carnosa. Amadurece em janeiro e fevereiro, tornando-se amarelo. Possui de uma a três sementes, com cotilédones unidos (LEGRAND; KLEIN, 1969; LORENZI, 2002; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

É uma planta heliófita, seletiva higrófila e semidecídua. Sua madeira tem grande utilidade, podendo ser usada como estaca, poste, moirão, lenha e carvão. Seus frutos são comestíveis, cultivados em pomares domésticos e consumidos na forma de suco, geleia e sorvete. São utilizados também para engorda de animais domésticos e consumidos por pássaros, ocasionando a dispersão das sementes, o que contribui largamente para o reflorestamento de áreas em degradação (LORENZI, 2002).

Estudos referentes à constituição química do óleo essencial das folhas de *E. pyriformis* da região sul do Brasil mostram que α -cadinol, δ -cadineno e β -cariofileno estão entre os constituintes majoritários (APEL *et al.*, 2004). Pesquisas também revelaram a presença de flavonoides nas folhas da espécie, que têm a propriedade de inibir a xantina-oxidase, sendo assim utilizadas no acúmulo de ácido úrico e no tratamento de gota (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 1987; THEODULOZ *et al.*, 1988).



FIGURA 1. *Eugenia pyriformis* CAMESS., MYRTACEAE.
ASPECTO GERAL NO HABITAT
FONTE: O AUTOR (2009)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados ramos foliares de *Eugenia pyriformis* Cambess. no Jardim Botânico de Curitiba, nas coordenadas aproximadas de 25° 26' S e 49° 14' W, e na altitude de 930 m. A planta foi identificada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR, pelo botânico Gert Hatschbach, e a exsicata está depositada sob o registro MBM 204990. A coleta foi realizada em junho de 2009, em campo limpo e borda de capão.

O material coletado foi devidamente preparado para a realização dos estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas.

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Os estudos morfoanatômicos foram realizados com folhas desenvolvidas, a partir do quarto nó, e com caules jovens, obtidos entre 5-30 cm do ápice caulinar. Para a determinação da morfologia externa foliar adotou-se a classificação de Hickey (1974). O material foi fixado em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e posteriormente estocado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

3.2.1 Lâminas semipermanentes

Foram feitos cortes transversais e longitudinais, incluindo-se paradérmicos, à mão livre, do material vegetativo fixado. Para as folhas, analisaram-se o pecíolo e o terço inferior do limbo. A coloração foi feita com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina a 50% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor (BEÇAK; PAULETE, 1976).

3.2.2 Lâminas permanentes

As lâminas permanentes foram obtidas a partir do material fixado, desidratado em série etanólica crescente e embocado em glicol-metacrilato (Leica Historesin[®]).

Os cortes obtidos no micrótomo de rotação Olympus CUT 4055 foram corados com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). As lâminas foram montadas com Entellan[®] (KRAUS; ARDUIN, 1997).

3.2.3 Testes microquímicos

Para a realização dos testes microquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material fixado, utilizando-se os seguintes reativos: floroglucina clorídrica para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudan III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), lugol para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e ácido sulfúrico para cristais de cálcio (OLIVEIRA; AKISUE, 1997).

Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias no microscópio fotônico Olympus BX-40, acoplado à unidade de controle PM-20.

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície (microscopia eletrônica de varredura - MEV) (SOUZA, 1998) foi realizada em lâmina foliar de amostras fixadas e desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico de CO₂ no equipamento Bal-Tec CPD-030. Estas foram aderidas a suporte, metalizadas com ouro no aparelho Balzers Sputtering SCD-030, submetidas a alto vácuo e observadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.

3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

Folhas e caules foram colocados para secar na estufa à temperatura de 40° C. As folhas foram trituradas em liquidificador. Os caules foram triturados, utilizando-se um moinho de martelo, para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração (SONAGLIO *et al.*, 1999).

Os procedimentos realizados referem-se à determinação de cinzas totais e resíduo sólido, à prospecção fitoquímica, bem como ao isolamento e à identificação de compostos químicos, e estão sumarizados na FIGURA 2.

3.3.1 Cinzas totais

Empregou-se o método gravimétrico descrito na F. Bras. IV (1988) para a determinação do teor de cinzas totais, no qual se incinera o material em mufla até eliminação do carvão, não ultrapassando a temperatura de 450° C e procede-se à pesagem do resíduo presente. A análise foi feita em triplicata e o resultado foi calculado em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original.

3.3.2 Resíduo sólido e prospecção fitoquímica

A determinação do resíduo sólido e a prospecção fitoquímica foram feitas com extratos obtidos de acordo com Moreira (1979) pelo método de maceração a quente, preparando-se extratos hidroalcoólico a 20% (m/v) e aquoso a 20% (m/v), separadamente de folha e caule.

O extrato hidroalcoólico a 20% (m/v) foi feito com o material vegetal triturado, macerado em álcool etílico a 70% (v/v) em BM a 60° C por 1 h e filtrado, mantendo-se o extrato sob refrigeração. Foi feito o fracionamento deste através de gradiente de polaridade com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O extrato aquoso a 20% (m/v) foi preparado com o material vegetal triturado colocado em contato com água destilada em BM a 60° C por 1 h. O macerado foi filtrado e mantido sob refrigeração.

A partir desses extratos determinaram-se o resíduo sólido e a presença dos seguintes grupos químicos:

A) Extrato hidroalcoólico e frações: alcaloides, glicosídeos flavônicos, cumarinas, antraquinonas e esteroides e/ou triterpenos

B) Extrato aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogênicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), ácidos fixos e ácidos voláteis

- Determinação de resíduo sólido

O resíduo sólido do extrato hidroalcoólico e das respectivas frações e do extrato aquoso foi obtido pela diferença de peso da alíquota antes e após a evaporação em estufa a 100° C, até peso constante. Os ensaios foram feitos em triplicata.

- Pesquisa de alcaloides

Foram utilizados os reativos gerais para detectar alcaloides por meio de turvação a precipitação: Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio), Bouchardat (iodo-iodeto de potássio) e Bertrand (ácido sílico-túngstico).

- Pesquisa de glicosídeos flavônicos

A pesquisa foi realizada por meio das reações de Shinoda, Taubock e Pacheco. Na reação de Shinoda as colorações diferenciais dos flavonoides revelam estruturas químicas diversas: flavonas com coloração amarelo a vermelho, flavonóis e di-hidroflavonóis com coloração vermelho a vermelho sangue, flavononas com coloração vermelho a violeta, e derivados antociânicos com coloração vermelho que passa a rosa. Chalconas, auronas, di-hidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

Na reação oxálico-bórica ou reação de Taubock, os flavonoides em geral desenvolvem fluorescência amarela esverdeada, enquanto que alguns dos seus derivados, como as flavonas e isoflavonas não apresentam essa propriedade. As antocianinas coram-se, sem produzir fluorescência.

Empregando-se acetato de sódio e anidrido acético no ensaio de Pacheco, os di-hidroflavonóis apresentam coloração roxa característica e as flavonas, as chalconas, as auronas e os flavonóis dão resposta negativa.

- Pesquisa de cumarinas

Cumarinas foram pesquisadas em meio básico e detectadas pela fluorescência azul ou verde amarelada sob luz UV.

- Pesquisa de antraquinonas

Para a pesquisa de antraquinonas foi realizada a reação de Bornträger, cujo resultado positivo se verifica pela coloração vermelha de antraquinonas livres em meio básico.

- Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

Para a detecção de esteroides e/ou triterpenos, foi efetuada a reação de Libermann Burchard. Frente a resultado positivo, foram executadas também as reações de Keller-Kiliani para desoxiaçúcares e de Baljet para lactonas pentacíclicas.

- Pesquisa de glicosídeos antociânicos

Alíquotas do extrato foram ajustadas a pH 4, 7 e 10 para verificar a mudança de coloração indicativa de glicosídeos antociânicos.

- Pesquisa de saponinas

A formação de espuma persistente, após agitação enérgica do extrato, indica a presença de saponinas.

- Pesquisa de glicosídeos cianogênicos

A formação de HCN, pela hidrólise dos glicosídeos cianogênicos em meio ácido, é revelada pela formação de cor vermelha em papel picro-sódico.

- Pesquisa de taninos

A pesquisa de taninos (hidrolisáveis e condensados) foi efetuada separadamente com cloreto férrico, gelatina e formol-clorídrico (Stiasny).

- Pesquisa de ácidos voláteis

O extrato acidificado foi levado em BM a 60° C para a evaporação de ácidos voláteis, que desenvolvem coloração vermelha em papel indicador.

- Pesquisa de ácidos fixos

A pesquisa dos ácidos fixos foi realizada com reagente de Nessler, pelo desenvolvimento de coloração alaranjada.

3.3.3 Isolamento e identificação de compostos químicos

A) Óleo essencial

Folhas trituradas (200 g) foram submetidas à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por Wasicky (1963), para essências menos densas que a água, sendo o óleo essencial coletado após o funcionamento ininterrupto do aparelho por 6 h. Os componentes majoritários do óleo essencial foram determinados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa em aparelho Varian CG modelo 3800, acoplado a espectrofotômetro de massa da marca Varian modelo 4000, e programa computacional MS-Workstation 6.1.9, através do qual foram identificados os componentes.

B) Extrato acetônico bruto e frações

O extrato acetônico bruto foi obtido a partir de 840 g de folha e 1 kg de caule extraídos com acetona a 30° C durante um período de 6 h em aparelho de Soxhlet modificado, no qual o sifão possui um alargamento em sua base, que evita o sifonamento do extrato e permite que a extração seja contínua (CARVALHO, 2001). Os extratos foram evaporados em BM a 60° C. As amostras foram eluídas separadamente em um sistema de solventes, água, metanol e acetona, em um processo de filtração sobre octadecilsílica (RP-18) da Lichroprep® (25–40 mesh). A fração obtida a partir da água foi descartada, eliminando-se os açúcares de menor importância, e as frações metanólica e acetônica foram posteriormente concentradas em aparelho rotavapor à temperatura de 50° C (APPENDINO *et al.*, 2008).

As frações metanólica e acetônica foram concentradas separadamente e dissolvidas em acetona e incorporadas em uma pequena quantidade de sílica para formar um pó seco e fino, depositado em um filtro sinterizado com papel de filtro. Foram realizadas colunas de sílica-gel 60 (0,063-0,02 mm/ 70-230 mesh), Masherey-Nagel® e alumínio (Aluminium oxide 90 neutral), pH 7 ± 0,5, utilizando

como gradientes éter de petróleo e acetato de etila (8:2 até 4:6). As alíquotas foram recolhidas (FIGURA 3) e o monitoramento foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD), na qual foram utilizadas placas Masherey-Nagel® 60 F₂₅₄ (0,25 mm), sendo estas mergulhadas em H₂SO₄ a 5% (v/v) em etanol e posteriormente aquecidas. As manchas foram observadas a olho nu e pelo UV em 360 nm para a diferenciação dos compostos, que foram reunidos e concentrados em rotavapor (APPENDINO *et al.*, 2008).

Para RMN de ¹³C e ¹H foi utilizado espectrofotômetro AC 200 Brucker® em 50 MHz e 200 MHz e os espectros de ¹H realizados na Itália foram lidos em 300 MHz, e para IV as amostras foram preparadas em pastilha de brometo de potássio anidro, comprimidas em aparelho Bomem-Hartmann & Braum e analisadas em Biored® FTS 3500 GX entre 400 e 4000 cm⁻¹.

Utilizou-se metanol em ebulição para purificação dos compostos da fração metanólica e o alumínio foi empregado para separação dos compostos da fração acetônica.

C) Extrato etanólico bruto e frações

A preparação do extrato bruto foi feita com etanol a 96° GL, em refluxo contínuo por 6 h, a 50° C, em aparelho de Soxhlet modificado. Para obtenção das frações, a partição líquido-líquido deu-se em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio, acetato de etila), sendo a fração remanescente a hidroalcoólica (CARVALHO, 2001).

O extrato etanólico bruto e as frações foram utilizados para realizar os testes das atividades antioxidante e biológicas. A toxicidade frente a *Artemia salina* foi também feita com o resíduo sólido hidroalcoólico.

3.3.4 Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações, utilizaram-se os métodos de DPPH (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MENSOR, 2001) e do complexo fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Para o método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foram levados o extrato bruto e as frações à secura em BM a 40° C e o material seco foi dissolvido em etanol, com concentração final de 200 µg/mL. Foi feito um branco para cada fração utilizando-se a solução das amostras e 1 mL de etanol. O controle foi preparado com etanol e DPPH. Empregaram-se a vitamina C e a rutina como padrões, com concentração final também de 200 µg/mL.

A porcentagem da atividade antioxidante foi obtida com os valores de absorbância (A) em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®, em 518 nm das amostras testadas por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição DPPH} = 100 - \left\{ \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controle}}} \right\}$$

Por regressão linear foi determinada a IC₅₀ (Concentração Inibitória Média), que corresponde às médias de três repetições ± desvio padrão. Para verificar a diferença estatística entre as amostras aplicou-se o teste estatístico Anova e para a localização das diferenças o teste de Tukey (p<0,05) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MENSOR, 2001).

No método de formação do complexo fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), as amostras foram preparadas igualmente ao método anterior e dissolvidas em solução etanólica com concentração final de 200 µg/mL. Foram utilizados como padrão a vitamina C e a rutina. Após adição da solução reagente do complexo fosfomolibdênio, realizaram-se as leituras de absorbância (A) em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®, em 695 nm. Para o cálculo da atividade antioxidante foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{vitamina C}}} \times 100$$

A atividade antioxidante da rutina foi calculada dividindo o seu valor de absorbância pelo valor de absorbância da atividade padrão da vitamina C, utilizando a fórmula anterior.

3.4 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os ensaios de atividades biológicas foram conduzidos com extrato etanólico bruto e frações, extrato acetônico bruto e compostos isolados preparados como descrito anteriormente.

3.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes foram realizados com o extrato etanólico bruto, com as frações hexânica, clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule, com o extrato acetônico bruto de folha e caule e com os compostos isolados a partir do extrato acetônico bruto de folha, todos foram feitos em duplicata.

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foram inoculadas bactérias em meio de cultura caldo Mueller-Hinton, sendo a concentração de microrganismos ajustada em comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland, para padronização dos inóculos (10^8 UFC/mL) dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. Os extratos e frações foram dissolvidos em etanol 10% e DMSO 2%. Foram utilizadas concentrações decrescentes dos extratos, 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL, 625 µg/mL, 312 µg/mL, 156 µg/mL, 78 µg/mL, 39 µg/mL, e frações, (200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12 µg/mL, 6 µg/mL, 3 µg/mL, 1 µg/mL). Para o controle de esterilidade, utilizaram-se 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de extrato ou fração na concentração de 10000 µg/mL e 400 µg/mL respectivamente. Para o controle negativo da atividade inibitória foi utilizado o diluente etanol 10% e DMSO 2% usado na preparação dos extratos. Para o controle positivo ou de viabilidade foram utilizados 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35° C por 16 a 20h. Decorrido esse intervalo de tempo foram acrescidos 20 µL de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazólio, Merck®) a 0,5% (v/v) e as microplacas foram reincubadas por 3 h a 35° C. Posteriormente, foi realizada a leitura dos resultados.

A presença de coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa de efeito inibitório de extrato ou frações, enquanto que a ausência da

coloração vermelha foi considerada prova positiva da ação inibitória (AYRES *et al.*, 2008; CLSI, 2009).

3.4.2 Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

O teste foi realizado em triplicata com as frações hexânica, clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica, e com o resíduo sólido hidroalcoólico. O controle positivo foi feito com sulfato de quinidina e o negativo com etanol. Após a eclosão dos ovos de *Artemia salina*, os náuplios foram colocados em contato com as frações e resíduo sólido diluídos (MEYER, 1982). Os dados de contagem de náuplios vivos e mortos foram analisados pelo método estatístico Probitos, sendo determinados a DL_{50} e o intervalo de confiança de 95%. As amostras foram consideradas com atividade citotóxica quando a DL_{50} teve resultado menor que 1000 ppm (FINNEY, 1956; MEYER, 1982).

3.4.3 Avaliação da atividade alelopática

Foi realizado um estudo da atividade alelopática, visando avaliar a influência do extrato etanólico bruto e das frações sobre sementes de *Lactuca sativa* L. (alface cultivar Baba de verão, da empresa Isla, com índice de germinação de 99%), empregando-se um total de vinte sementes em quatro repetições em caixa gerbox. O teste foi realizado em duplicata.

Para o teste de germinação das sementes, as observações foram feitas diariamente, durante sete dias, sendo excluídas as que germinavam. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado para cada repetição de tratamento, sendo calculado de acordo com a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo dia da germinação e somando-se até o último dia da germinação. As médias obtidas do IVG foram submetidas ao teste Skott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Para o teste de crescimento, o material foi mantido no germinador e no último dia procedeu-se à verificação dos resultados. Para cada semente foi medido o tamanho da radícula e do hipocótilo com papel milimetrado. Os resultados foram submetidos ao teste de Scott-Knott para determinação das médias. Como controle positivo foi utilizado o etanol e como controle negativo a água, tanto para

germinação quanto para o crescimento (DIETZ; WINTERHALTER, 1996; FERREIRA; AQUILA, 2000; MALHEIROS; PERES, 2001).

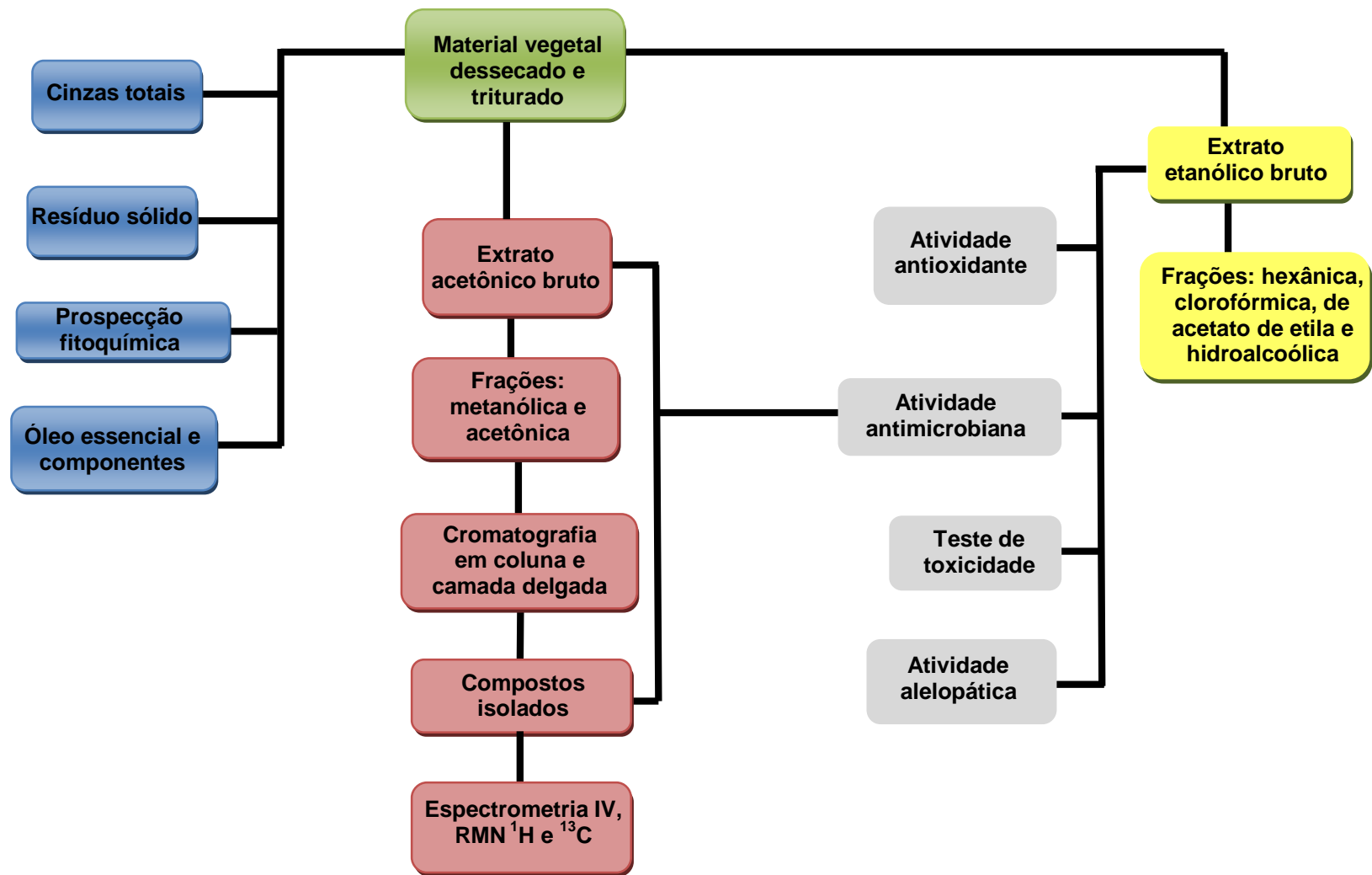


FIGURA 2. FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

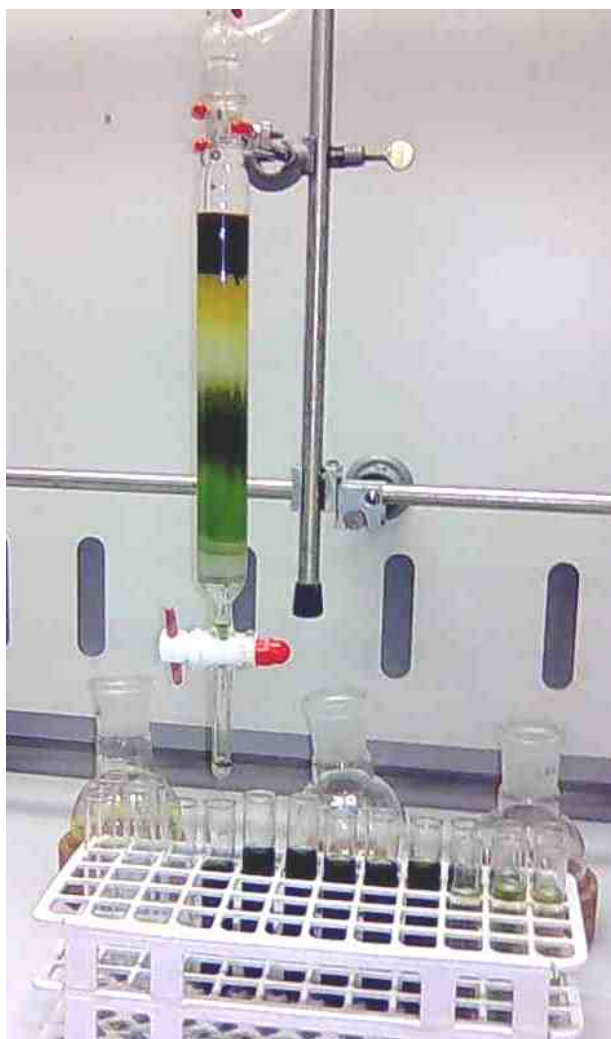


FIGURA 3. COLUNA CROMATOGRÁFICA DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO, PROVENIENTES DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE
FONTE: O AUTOR, 2010

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As folhas de *Eugenia pyriformis* Cambess. têm filotaxia oposta, são simples e possuem cerca de 3,5 a 7 cm de comprimento por 1,5 a 2,5 cm de largura, com pecíolos de 3 a 6 mm. São simétricas, elíptico-lanceoladas, com ápice agudo e base também aguda, margens inteiras (FIGURAS 4, 5) e textura subcoriácea. O pecíolo é normal, pois é de secção transversal praticamente circular, sendo levemente achatado na face adaxial, sem espessamentos notáveis ou outros processos. A nervação da folha é camptódroma-broquidódroma, em que as nervuras secundárias não terminam na margem, se unindo em forma de arcos proeminentes.

O limbo, em vista frontal, apresenta células epidérmicas com formato poligonal a levemente ondulado em ambas as faces (FIGURAS 6, 7), e revestidas por cutícula estriada (FIGURA 8). Os estômatos são do tipo anomocítico (FIGURA 7) e ocorrem na superfície abaxial (folha hipoestomática) (FIGURAS 7, 10, 11). Numerosos tricomas tectores, simples, unicelulares, com paredes espessadas, ponta aguda e inclinados sobre a epiderme (FIGURAS 7-10) ocorrem predominantemente na superfície abaxial (FIGURAS 9-11).

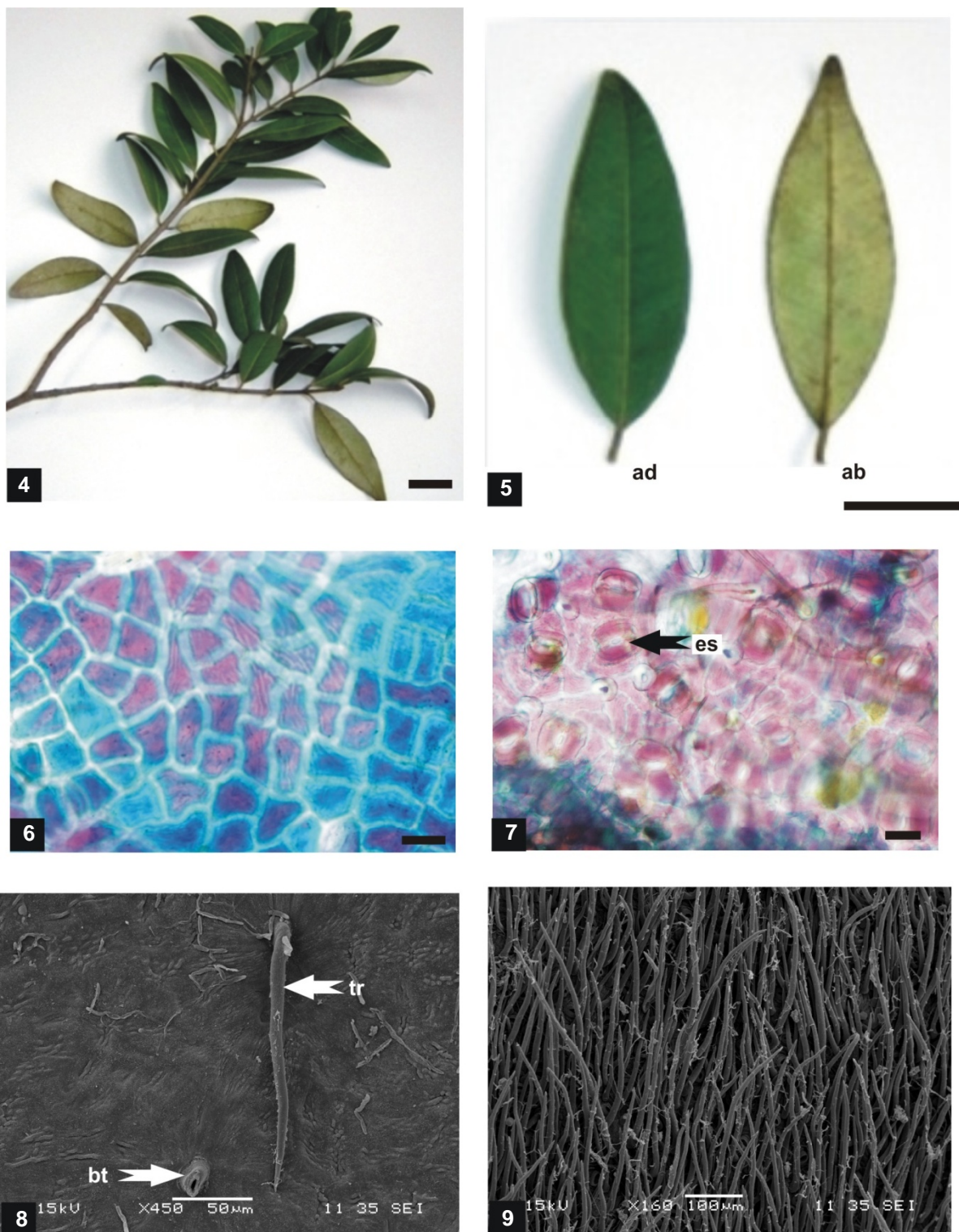
Em secção transversal da região internervural (FIGURAS 12-14), a epiderme é uniestratificada, sendo as células da face adaxial comparativamente maiores que as da abaxial. As células da epiderme são alongadas periclinalmente e revestidas por uma cutícula moderadamente espessada. Os estômatos estão inseridos no mesmo nível que as células adjacentes e as células-guarda possuem cristas cuticulares externas evidentes (FIGURAS 12-14).

O mesofilo é dorsiventral (heterogêneo assimétrico) (FIGURAS 13, 14), consistindo geralmente de um estrato de parênquima paliçádico e de cerca de sete camadas de parênquima esponjoso, este representando cerca de 60% da altura dos clorênquimas. No mesofilo ocorrem cavidades secretoras, preferentemente junto à face adaxial (FIGURAS 14, 15), revelando a presença de conteúdo lipofílico. São encontrados numerosos cristais de oxalato de cálcio, dos tipos drusa e frequentemente prisma (FIGURA 16). Distribuídos no mesofilo, há feixes vasculares de pequeno porte, do tipo colateral e envoltos por uma bainha do feixe esclerenquimática (FIGURA 13).

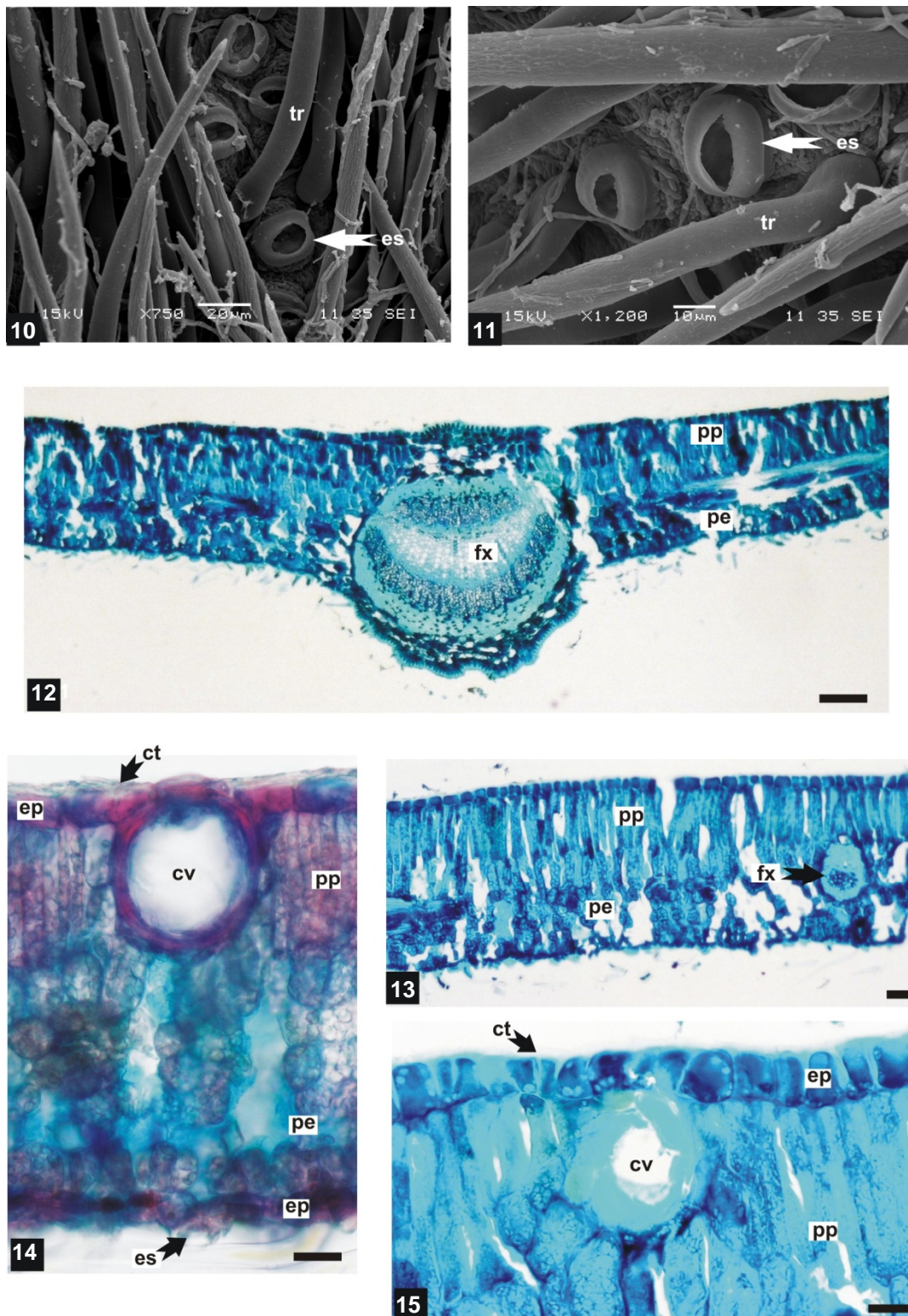
Em secção transversal, a nervura central tem contorno plano-convexo (FIGURAS 12, 17). A epiderme é uniestratificada e as células mostram paredes periclinais externas convexas, sendo revestidas por uma cutícula espessada que forma flanges cuticulares (FIGURA 18). Na sequência, são observados colênquima angular junto a ambas as faces e um único feixe vascular do tipo bicolateral, em arco aberto (FIGURAS 17-19). Esse feixe é circundado por uma bainha esclerenquimática, com predominância de fibras (FIGURAS 17-19), e por uma bainha cristalífera. Ocorrem também prismas (FIGURA 20) e algumas drusas de oxalato de cálcio, amiloplastos e compostos fenólicos.

Seccionado transversalmente, o pecíolo revela formato praticamente circular (FIGURAS 21, 22). A epiderme é uniestratificada e a cutícula que a reveste é moderadamente espessada e forma flanges cuticulares (FIGURA 23). Os tricomas são semelhantes aos descritos na nervura central. Encontram-se algumas camadas de colênquima angular, cavidades secretoras semelhantes às do limbo (FIGURA 22), numerosos idioblastos contendo prismas (FIGURA 23) e drusas de oxalato de cálcio, e um único feixe vascular bicolateral (FIGURAS 23, 24), em arco aberto (FIGURAS 21-23), circundado por uma bainha com lignificação incipiente. Amiloplastos e células com conteúdo fenólico estão presentes.

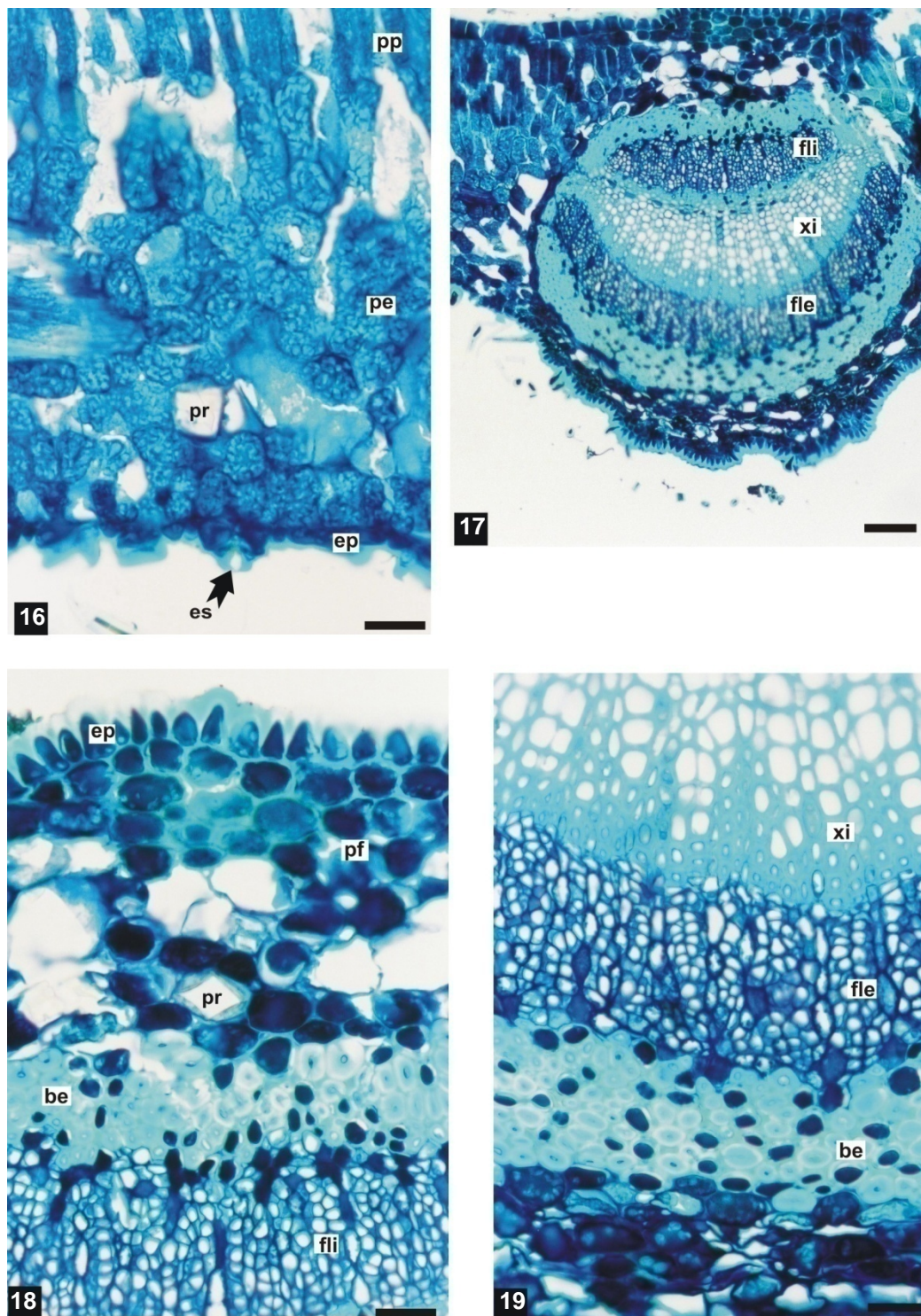
O caule mostra secção transversal circular. O sistema de revestimento consiste de uma periderme (FIGURAS 25-27), cujo felogênio tem instalação superficial. O súber, localizado externamente, constitui-se de várias camadas de células tabulares (FIGURA 28), com impregnação de suberina e lignina. No córtex há numerosas camadas de parênquima cortical (FIGURAS 27, 28). O cilindro vascular consiste de floema externo, xilema e floema interno, percorridos por raios estreitos (FIGURAS 28, 29). O xilema é totalmente lignificado e possui elementos traqueais de diâmetro relativamente pequeno. Fibras e células pétreas isoladas ou em pequenos grupos são encontradas no córtex, no floema externo e na medula (FIGURAS 28-30). Ocorrem numerosas células com conteúdo fenólico, prismas (FIGURA 30) e algumas drusas de oxalato de cálcio.



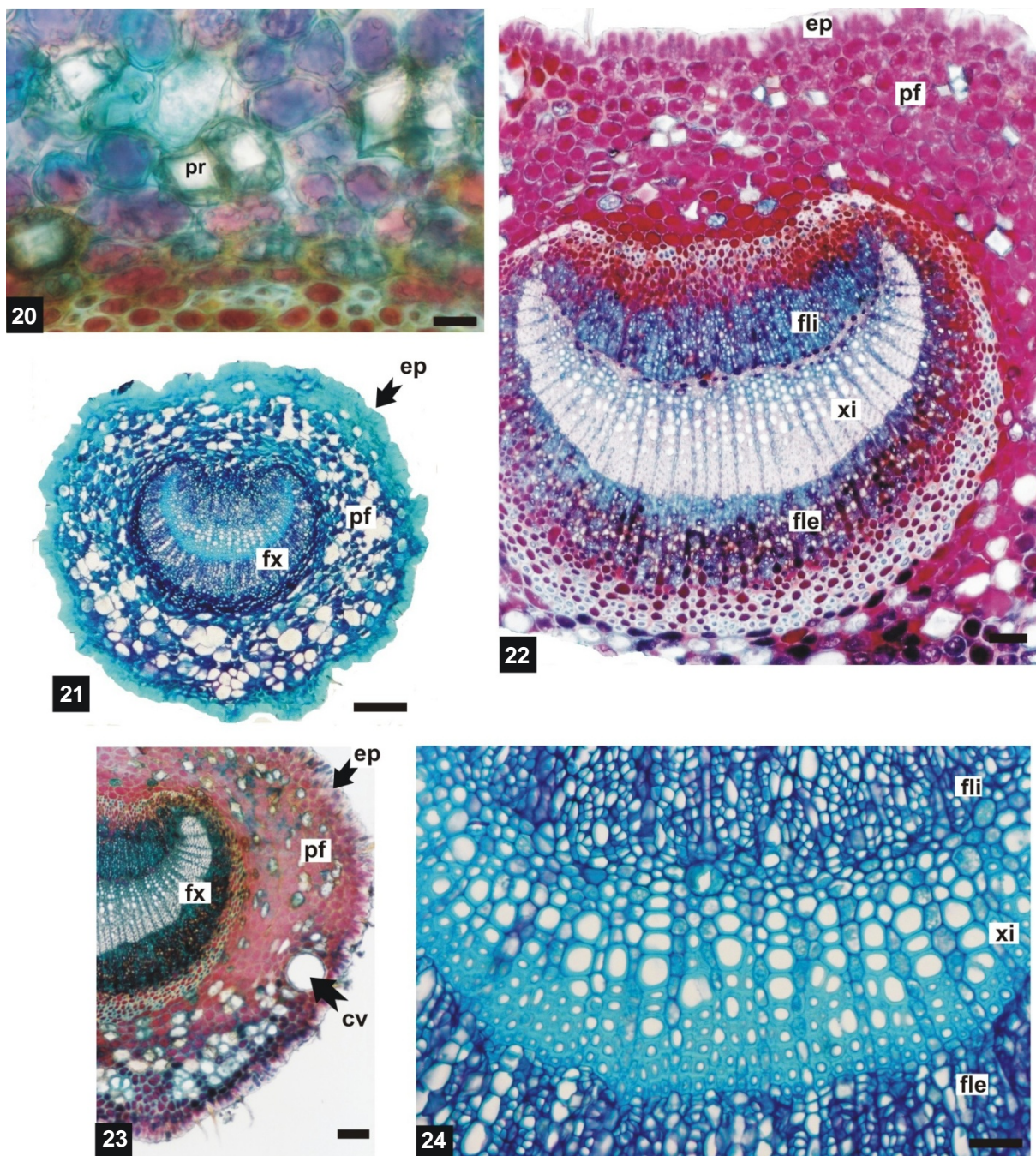
FIGURAS 4-9. *Eugenia pyriformis* CAMESS., MYRTACEAE: 4. RAMO VEGETATIVO APICAL; 5. FOLHAS SIMPLES, FACES ADAXIAL E ABAXIAL; 6. FACE ADAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 7. FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 8. TRICOMA TECTOR NA FACE ADAXIAL DA EPIDERME FOLIAR; 9. NUMEROSOS TRICOMAS TECTORES NA FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR. ABREVIATURAS: ab- FACE ABAXIAL, ad- FACE ADAXIAL, bt- BASE DE TRICOMA, es- ESTÔMATO, tr- TRICOMA. BARRA= 2 cm (4, 5), 20 μ m (6, 7)



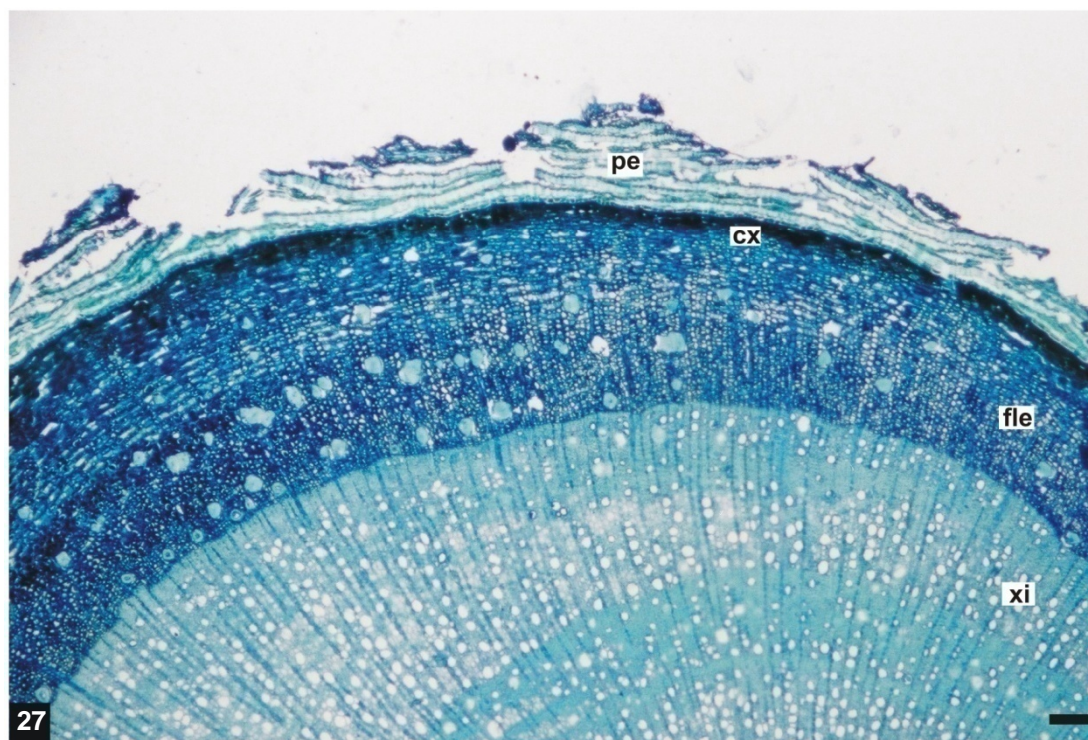
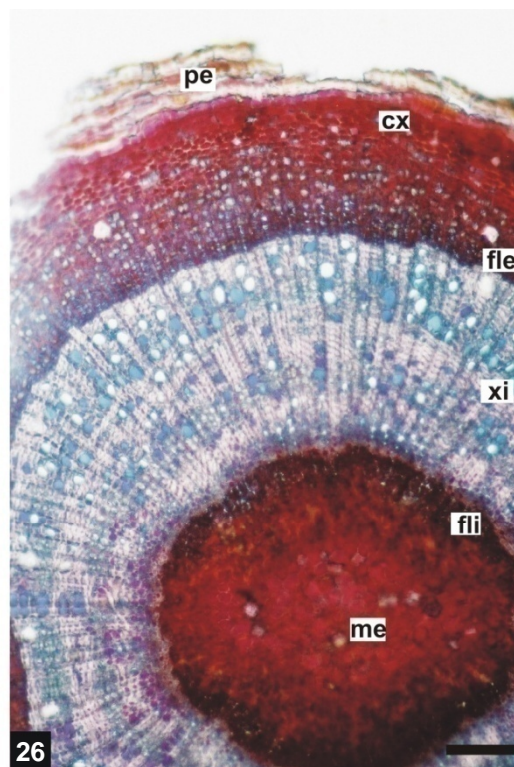
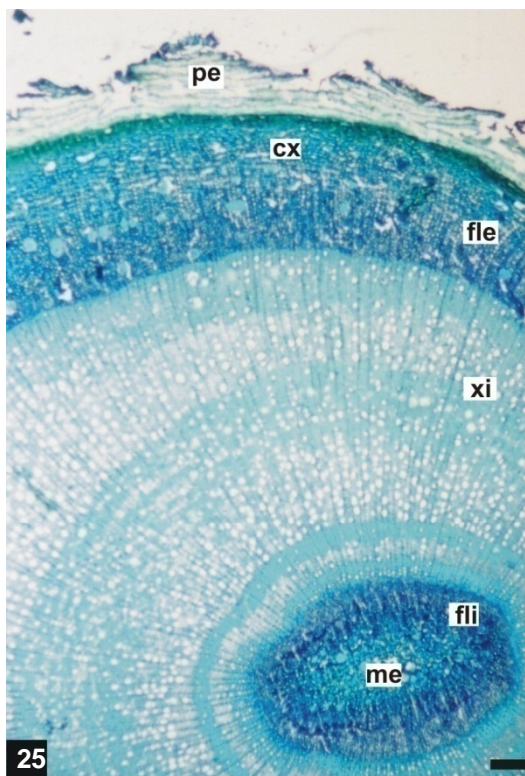
FIGURAS 10-15. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FOLHA: 10,11. TRICOMAS TECTORES E ESTÔMATOS NA FACE ABAXIAL DA EPIDERME; 12. SECÇÃO TRANSVERSAL DO LIMBO; 13. SECÇÃO TRANSVERSAL DA REGIÃO INTERNERVURAL, INDICANDO FEIXE VASCULAR DE PEQUENO PORTE; 14. SECÇÃO TRANSVERSAL DA REGIÃO INTERNERVURAL, MOSTRANDO MESOFILO DORSIVENTRAL E CAVIDADE SECRETORA; 15. DETALHE DE UMA CAVIDADE SECRETORA. ABREVIATURAS: ct- CUTÍCULA, cv- CAVIDADE SECRETORA, ep- EPIDERME, es- ESTÔMATO, fx- FEIXE VASCULAR, pe- PARÊNQUIMA ESPONJOSO; pp- PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO; tr- TRICOMA. BARRA= 100 μ m (12), 50 μ m (13), 20 μ m (14, 15)



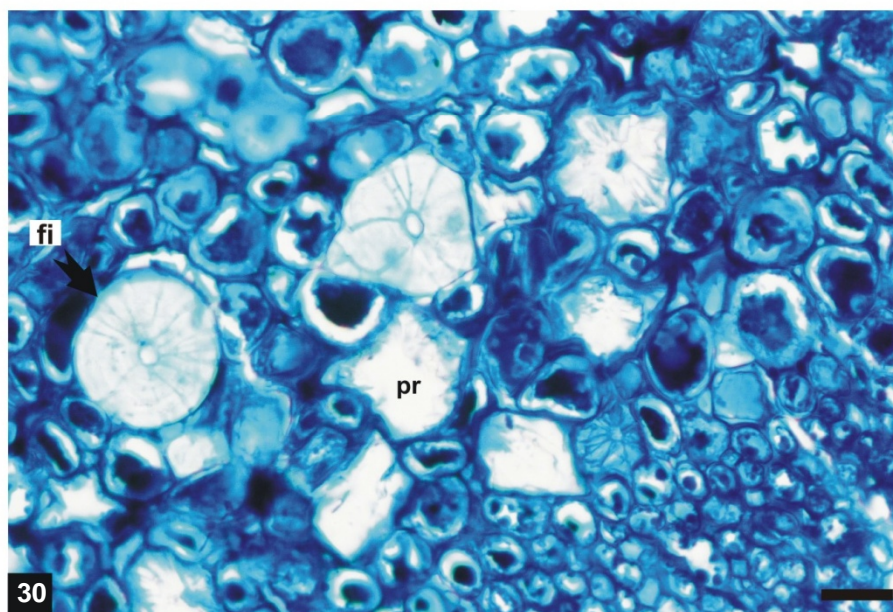
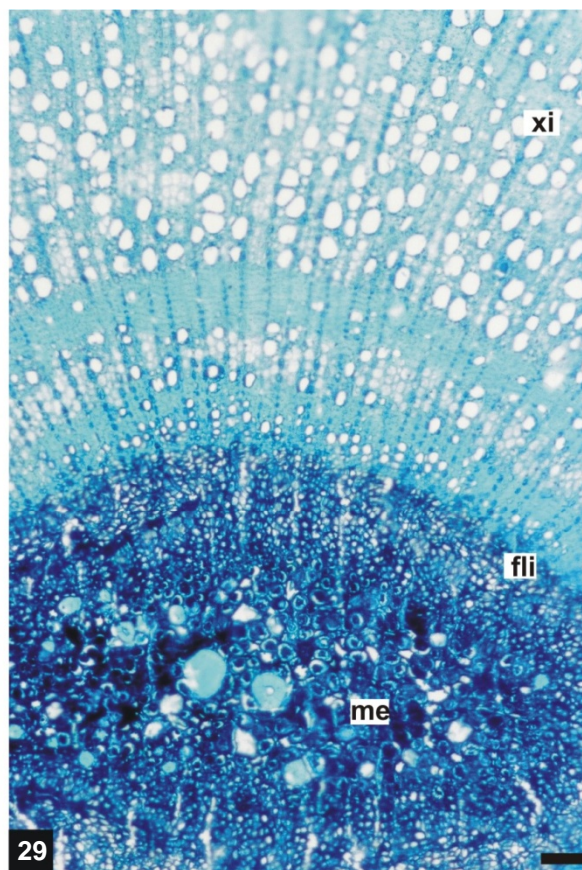
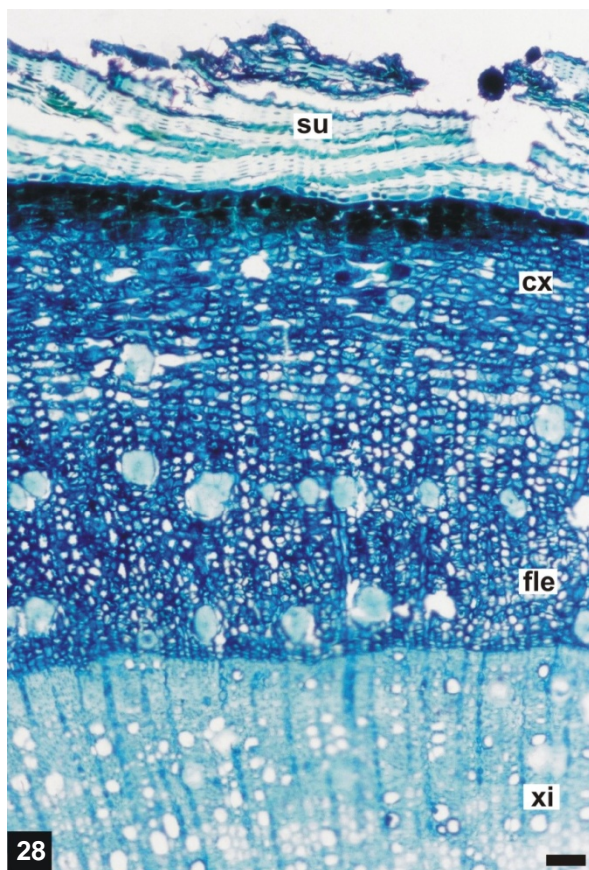
FIGURAS 16-19. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FOLHA, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 16. PORMENOR DE UM ESTÔMATO NA FACE ABAXIAL E PRISMA DE OXALATO DE CÁLCIO; 17. FEIXE VASCULAR BICOLATERAL DA NERVURA CENTRAL; 18. DETALHE DA NERVURA CENTRAL, JUNTO À FACE ADAXIAL, MOSTRANDO PARTE DA BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA E DO FLOEMA INTERNO; 19. NERVURA CENTRAL, JUNTO À FACE ABAXIAL, EM QUE SE INDICAM XILEMA E FLOEMA EXTERNO. ABREVIATURAS: be- BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, ep- EPIDERME, fle- FLOEMA EXTERNO, fli- FLOEMA INTERNO, pe- PARÊNQUIMA ESPONJOSO, pf- PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, pp- PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, pr- PRISMA, xi- XILEMA. BARRA= 20 μ m (16, 18, 19), 50 μ m (17)



FIGURAS 20-24. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FOLHA, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 20. PRISMA DE OXALATO DE CÁLCIO; 21, 22. ASPECTO GERAL DO PECÍOLO; 23. FEIXE VASCULAR BICOLATERAL DO PECÍOLO; 24. PORMENOR DO FEIXE VASCULAR DO PECÍOLO. ABREVIATURAS: cv- CAVIDADE SECRETORA, ep- EPIDERME, fle- FLOEMA EXTERNO, fli- FLOEMA INTERNO, fx- FEIXE VASCULAR, pf- PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL, pr- PRISMA, xi- XILEMA. BARRA= 20 μ m (20, 24), 50 μ m (23), 100 μ m (22), 200 μ m (21)



FIGURAS 25-27. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE: 25, 26. ORGANIZAÇÃO GERAL; 27. PERIDERME, CÓRTEX E CILINDRO VASCULAR. ABREVIATURAS: cx- CÓRTEX, ep- EPIDERME, fle- FLOEMA EXTERNO, fli- FLOEMA INTERNO, me- MEDULA, pe- PERIDERME, pr- PRISMA, xi- XILEMA. BARRA= 20 μ m (25), 50 μ m (26); 100 μ m (27)



FIGURAS 28-30. *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. CAULE, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 28. DETALHE DE SÚBER, CÓRTEX, FLOEMA EXTERNO E XILEMA; 29. XILEMA, FLOEMA INTERNO E MEDULA; 30. PORMENOR DE FIBRAS E PRISMAS NA MEDULA. ABREVIATURAS: cx- CÓRTEX, fi- FIBRA, fle- FLOEMA EXTERNO, fli- FLOEMA INTERNO, me- MEDULA, pr- PRISMA, su- SÚBER, xi- XILEMA. BARRA= 20 μ m (30); 50 μ m (28, 29)

Com relação à morfologia externa foliar de *E. pyriformis*, foi constatada semelhança com os aspectos atribuídos à mesma espécie por Legrand e Klein (1969) e Lorenzi (2002). Em estudo de vascularização de folha e identificação de representantes de *Eugenia*, *E. pyriformis* examinada por Cardoso e Sajo (2006) revelou nervação camptódroma-broquidódroma, da mesma forma que nesta investigação. Em concordância com espécies afins, esse padrão foi verificado também em *E. umbelliflora* O. Berg (guapê) (MEDEIROS, 2000) e *E. florida* DC. (DONATO; MORRETES, 2009).

Quanto à anatomia foliar, as características comuns às Myrtaceae (METCALFE; CHALK, 1950) e que são descritas em *E. pyriformis* nesta análise consistem de epiderme unisseriada, tricomas tectores unicelulares, estômatos anomocíticos, cavidades secretoras, floema interno, células contendo compostos fenólicos e cristais de oxalato de cálcio. Essas estruturas são consideradas comuns no táxon, tendo sido verificadas em representantes de diferentes gêneros, tais como *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (guabioba), *Myrcia cordifolia* O. Berg, *M. decrescens* O. Berg, *M. torta* DC. (GOMES *et al.*, 2009), *M. sphaerocarpa* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC. (pedra-hume-caá) (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000), *Hexachlamys edulis* (O. Berg) Kausel & D. Legrand (LORCA; AMAT; GONZÁLEZ, 1995) e *Melaleuca* spp. (SILVA, 2007). Embora esses aspectos comuns sejam de fácil reconhecimento na análise microscópica, favorecendo o controle farmacognóstico, e sejam relevantes na taxonomia da família, carecem de valor diagnóstico na identificação de espécies.

Diante dessa constatação, outros caracteres anatômicos devem ser avaliados para diferenciação de *E. pyriformis*, como por exemplo, a ocorrência de folha anfiestomática e de mesofilo isobilateral nas espécies de *Melaleuca* estudadas por Silva (2007) e a observação de longos tricomas e de hipoderme em *H. edulis* relatada por Lorca, Amat e González (1995). Esses dados se contrapõem à presente análise, em que *E. pyriformis* mostra folha hipoestomática, mesofilo dorsiventral, tricomas relativamente menores e ausência de hipoderme.

Em comparação com outros membros de *Eugenia*, de um modo geral, constata-se semelhança anatômica representada por folha com estômatos restritos à superfície abaxial, cutícula estriada, células epidérmicas com contorno poligonal a ondulado em vista frontal, mesofilo dorsiventral, nervura central com um feixe vascular bicolateral em arco aberto e envolto por bainha esclerenquimática,

cavidades secretoras preferentemente subepidérmicas, drusas e prismas de oxalato de cálcio e compostos fenólicos (FONTENELLE; COSTA; MACHADO, 1994; LORCA; AMAT; GONZÁLEZ, 1995; JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000; MEDEIROS, 2000; DONATO; MORRETES, 2007; 2009; ALVES; TRESMONDI; LONGUI, 2008).

A diferenciação pode ser efetuada com relação à espécie desta investigação, pelo fato de *E. uniflora* L. (pitanga) possuir cutícula delgada e estômatos paracíticos, de acordo com Lorca, Amat e González (1995). Esse padrão estomático também foi relatado em *E. florida* (DONATO; MORRETES, 2009). Mesofilo isobilateral de *E. copacabanensis* Kiaersk. (FONTENELLE; COSTA; MACHADO, 1994) e o contorno côncavo-convexo da nervura central, em secção transversal, de *E. brasiliensis* Lam. (grumixama) (DONATO; MORRETES, 2007) representam também elementos diferenciadores. Isso se estabelece se for tomado por base que *E. pyriformis* exibe cutícula moderadamente espessada, estômatos anomocíticos, mesofilo dorsiventral e nervura central plano-convexa.

O aspecto do pecíolo pode contribuir adicionalmente na caracterização de espécies, como observado por Fontenelle, Costa e Machado (1994). De acordo com esses pesquisadores, *E. maricaensis* G.M. Barroso possui um feixe vascular em disposição cêntrica no pecíolo, enquanto *E. schottiana* O. Berg revela um feixe vascular em arco fechado, em oposição ao arco aberto encontrado neste trabalho.

No entanto, o valor diagnóstico atribuído a diferentes estruturas deve ser considerado criteriosamente, porque podem estar sujeitas a influências ambientais (CUTTER, 1986). A título de exemplificação, Alves, Tresmondi e Longui (2008) demonstraram que a dimensão das folhas de *E. uniflora* varia entre plantas de meio urbano e rural. Os poluentes das cidades podem ser responsáveis por folhas menores, elevada proporção de parênquima paliçádico, redução dos espaços intercelulares, maior densidade estomática e aumento da quantidade de cristais. Por sua vez, Donato e Morretes (2007), avaliando *E. brasiliensis* proveniente de áreas de restinga e de floresta, concluíram que a incidência luminosa elevada no litoral determina aumentos de espessura foliar, espessamento e grau de lignificação de paredes celulares, densidade estomática e vascular, concentração de compostos ergásticos, altura do parênquima paliçádico e número de estratos do esponjoso. Esses mesmos autores (2009) verificaram que folhas de sol e de sombra de *E. florida* apresentam diferenças, tendo as primeiras características semelhantes às de folha de restinga do estudo anterior.

Em se tratando de cavidades secretoras, na opinião de Gomes *et al.* (2009), nas espécies em que estas assumem uma posição subepidérmica estabelece-se uma origem a partir do meristema epidérmico, sem a participação do meristema fundamental. Embora não se tenham conduzidos estudos ontogenéticos neste trabalho, em *E. pyriformis* essas estruturas secretoras internas têm formação esquizolisígena, de acordo com Lorca, Amat e González (1995).

Com referência ao caule, a organização estrutural de *E. pyriformis* corresponde à descrição de Metcalfe e Chalk (1950) para Myrtaceae e *Eugenia*, consistindo de felogênio instalado periféricamente, floema externo, xilema e floema interno formando cilindros contínuos atravessados por raios estreitos, células pétreas, compostos fenólicos, cristais de oxalato de cálcio e elementos de vaso de lúmen pequeno.

Apesar de Soffiatti e Angyalossy-Alfonso (1999) terem examinado caules adultos com maior espessura de *E. cerasiflora* Miq. e *E. uniflora*, algumas semelhanças podem ser identificadas comparativamente ao caule jovem de *E. pyriformis*, tais como presença de floema interno, raios de uma a três fileiras de células percorrendo o sistema vascular, inclusões representadas por cristais prismáticos, fibras e esclereídes. Muitas destas, pela descrição apresentada pelos autores, são equivalentes às células pétreas (braquiesclereídes) relatadas nesta investigação.

Com base nas observações realizadas, os caracteres morfoanatômicos devem ser considerados em conjunto para a identificação de *E. pyriformis*, com especial ênfase ao tipo de estômato e à localização dos mesmos nas superfícies epidérmicas foliares, à classificação do mesofilo, ao contorno da nervura central e ao aspecto do feixe vascular no pecíolo.

4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.2.1 Determinação do teor de cinzas e resíduo sólido da amostra vegetal

Os valores obtidos na determinação de cinzas de folha e caule, bem com do resíduo sólido dos extratos hidroalcoólico e aquoso estão sumarizados na TABELA 1.

TABELA 1. DETERMINAÇÃO DE CINZAS E RESÍDUO SÓLIDO DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

AMOSTRA	PARÂMETRO				
	Cinzas totais (g%)			Resíduo sólido de extratos	
				Hidroalcoólico (g%)	Aquoso (g%)
FOLHA	6,88	6,82	6,60	17,50	5,00
Média/Desvio padrão	6,77 ± 0,147				
CAULE	2,81	2,89	2,76	3,50	2,00
Média/Desvio padrão	2,82 ± 0,025				

4.2.2 Prospecção fitoquímica

Os resultados obtidos na prospecção fitoquímica para os extratos hidroalcoólico e aquoso e frações de folha e caule constam dos QUADROS 1 e 2.

QUADRO 1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA E DE ACETATO DE ETILA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

GRUPOS QUÍMICOS	EXTRATO HIDROALCOÓLICO	FRAÇÕES		
		Hexânica	Clorofórmica	Acetato de etila
Alcaloides	-	-	-	-
Glicosídeos flavônicos	+	-	+	+
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Esteroides/ Triterpenoides	-	+	+	-
Desoxiaçúcares	-	-	+	-
Lactonas pentacíclicas	-	+	+	-

QUADRO 2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

GRUPOS QUÍMICOS	EXTRATO AQUOSO
Glicosídeos antociânicos	-
Saponinas	+
Glicosídeos cianogênicos	-
Taninos	+
Ácidos fixos	+
Ácidos voláteis	-

A prospecção fitoquímica revela a presença de glicosídeos flavônicos e esteroides e/ou triterpenoides particularmente no extrato hidroalcoólico de folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos são detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule de *E. pyriformis*. Em comparação com os poucos estudos publicados para o gênero, resultados parcialmente concordantes foram apresentados para *E. uniflora* por Fiuza *et al.* (2008), autores que verificaram a ocorrência de antraquinonas, em adição aos compostos químicos anteriormente citados. Em *E. dysenterica*, Couto *et al.* (2009) confirmaram a presença de glicosídeos flavônicos, terpenoides e saponinas.

4.2.3 Identificação de componentes químicos do óleo essencial

Após o processo de hidrodestilação, o teor do óleo essencial foi de 0,35 mL em 100g de folha dessecada, sendo que o cromatograma da FIGURA 31 representa a análise do óleo por CG-EM. Alguns componentes foram identificados pelo programa computacional Biblioteca NIST e constam da TABELA 2.

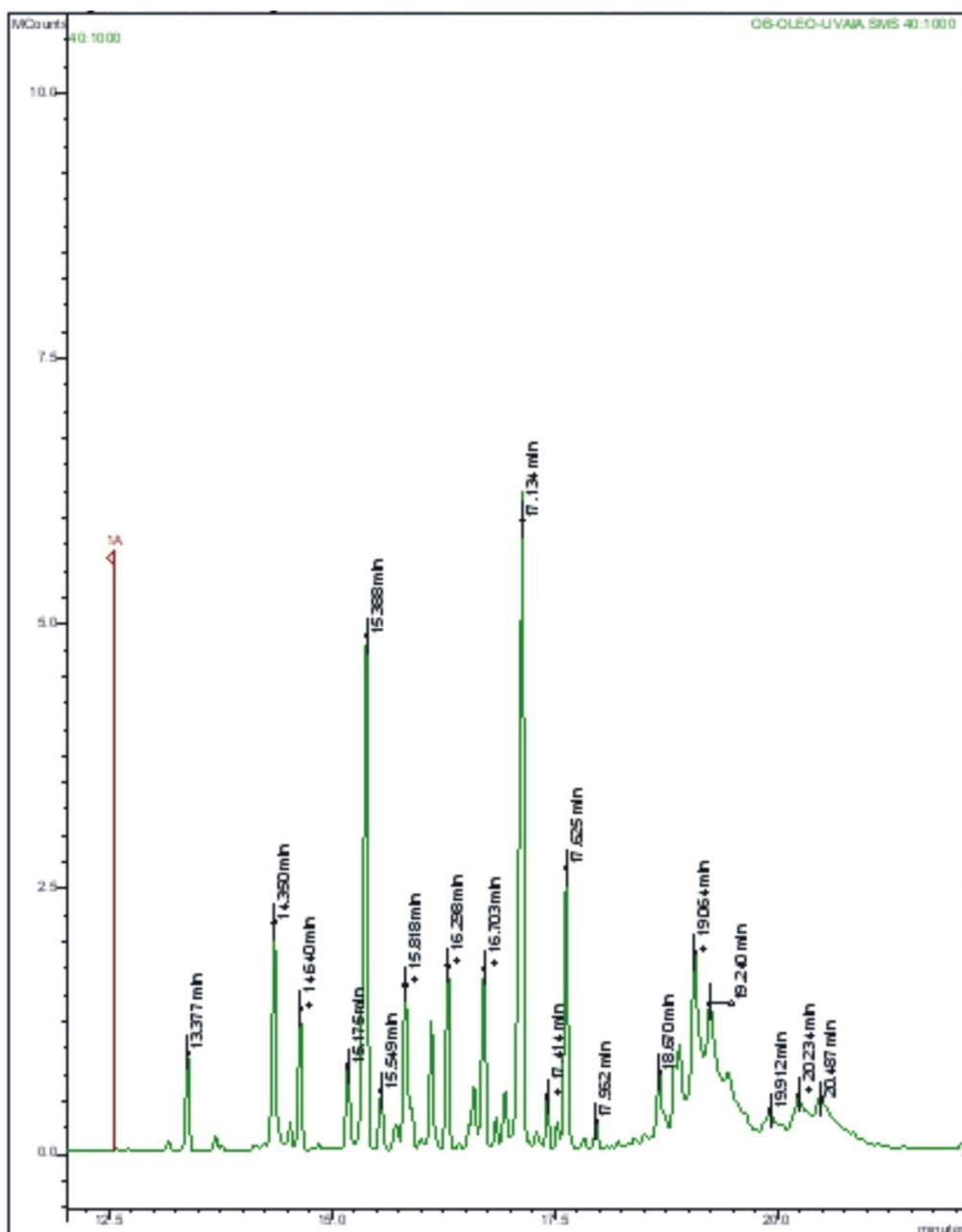


FIGURA 31. CROMATOGRAMA ANALISADO POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis*, CAMBESS., MYRTACEAE

TABELA 2. COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPOSTO QUÍMICO	FÓRMULA
6,145	1,4-cicloexadieno-1-metil-4-(1-metil-etil)	C ₁₀ H ₁₆
6,411	<i>o</i> -cimeno	C ₁₀ H ₁₄
6,622	1,8-cineol	C ₁₀ H ₁₈ O
7,833	linalol	C ₁₀ H ₁₈ O
9,497	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O
13,377	2-careno	C ₁₀ H ₁₆
14,470	terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆
14,531	di- <i>t</i> -butilacetileno	C ₁₀ H ₁₈
14,938	<i>p</i> -benzoquinona-2,6-di- <i>tert</i> -butil	C ₁₄ O ₂ H ₂
16,703	retinal	C ₂₀ H ₂₈ O
16,886	ni	C ₁₅ H ₂₂ O
18,414	<i>m</i> -metoxifenil-éter	C ₁₃ H ₁₂ O ₂
18,656	ni	C ₁₃ H ₂₄ O
19,083	ni	C ₁₅ H ₂₄ O

Nota:ni - não identificado

As substâncias encontradas no óleo essencial podem variar de acordo com o ambiente, com o local de coleta e com o clima (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; STEFANELLO *et al.*, 2009) A maioria dos compostos encontrados são derivados terpênicos, como os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, e alguns sesquiterpenos, caracterizados pelo pico de retenção, porém não identificados.

Em estudos realizados no óleo essencial de folha de *E. uniflora* por Ogunwande *et al.* (2005) também foram observados monoterpenos e sesquiterpenos. Os compostos majoritários foram curzereno, selina-1,3,7-11-trien-8-ona, atractilona e furanodieno. Em menor quantidade foi detectado terpinoleno, que também está presente na espécie desta análise.

No óleo essencial de folhas de *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. foram encontrados em grande quantidade monoterpenos oxigenados e em menor quantidade sesquiterpenos oxigenados, dentre os quais o β -cariofileno e o α -cadinol, que também foram observados em *E. pyriformis* por Apel *et al.* (2004). Comparando-

se com o presente estudo, componentes semelhantes aos de *E. pyriformis*, como o 1,8-cineol, o linalol, o terpinen-4-ol, foram observados em *E. puniceifolia*, na qual o linalol predominou.

Em estudo comparativo da constituição química do óleo essencial de folhas de *E. beaurepaireana* e de *E. pyriformis* realizado por Apel *et al.* (2004) demonstrou-se que as duas espécies possuem composição qualitativamente similar, sendo os constituintes majoritários representados por α -cadinol, δ -cadineno e β -cariofileno, os quais não são observados nesta investigação.

Comparando-se com outra análise do óleo essencial de folhas de *E. pyriformis* por Stefanello *et al.* (2009), observam-se alguns compostos semelhantes como 1,8-cineol e terpinen-4-ol.

Para melhor elucidação dos componentes do óleo essencial serão necessários métodos de extração com solventes diferentes (etanol, hexano, clorofórmio) e outros de identificação, como por exemplo de ressonância magnética nuclear (RMN), para demonstrar com exatidão a constituição qualitativa e quantitativa do mesmo.

4.2.4 Isolamento e identificação de compostos químicos

Foram isolados cinco compostos das folhas de *E. pyriformis*: três da fração metanólica do extrato acetônico bruto denominados de LA4D, LA16E e LA18A, e dois da fração acetônica que foram designados de LA6A e LA7A. Destes, apenas três foram obtidos em quantidades suficientes para identificação: LA4D, LA6A e LA7A. No caule, foram encontrados os mesmos compostos que na folha, mas em quantidades insignificantes.

O composto denominado de LA4D (522 mg) tem aspecto de pó branco e apresenta espectro de absorção no IV conforme a FIGURA 32.

No espectro de IV, na região de 2947 cm^{-1} a 2853 cm^{-1} , há deformações axiais que caracterizam grupamentos alicíclicos C-H. A região de 1464 a 1360 cm^{-1} é correspondente a grupamentos alicíclicos de C-H. Nas regiões de 1030 cm^{-1} e de 989 cm^{-1} podem ser observadas deformações angulares que correspondem aos grupamentos O-H e C-H, respectivamente (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

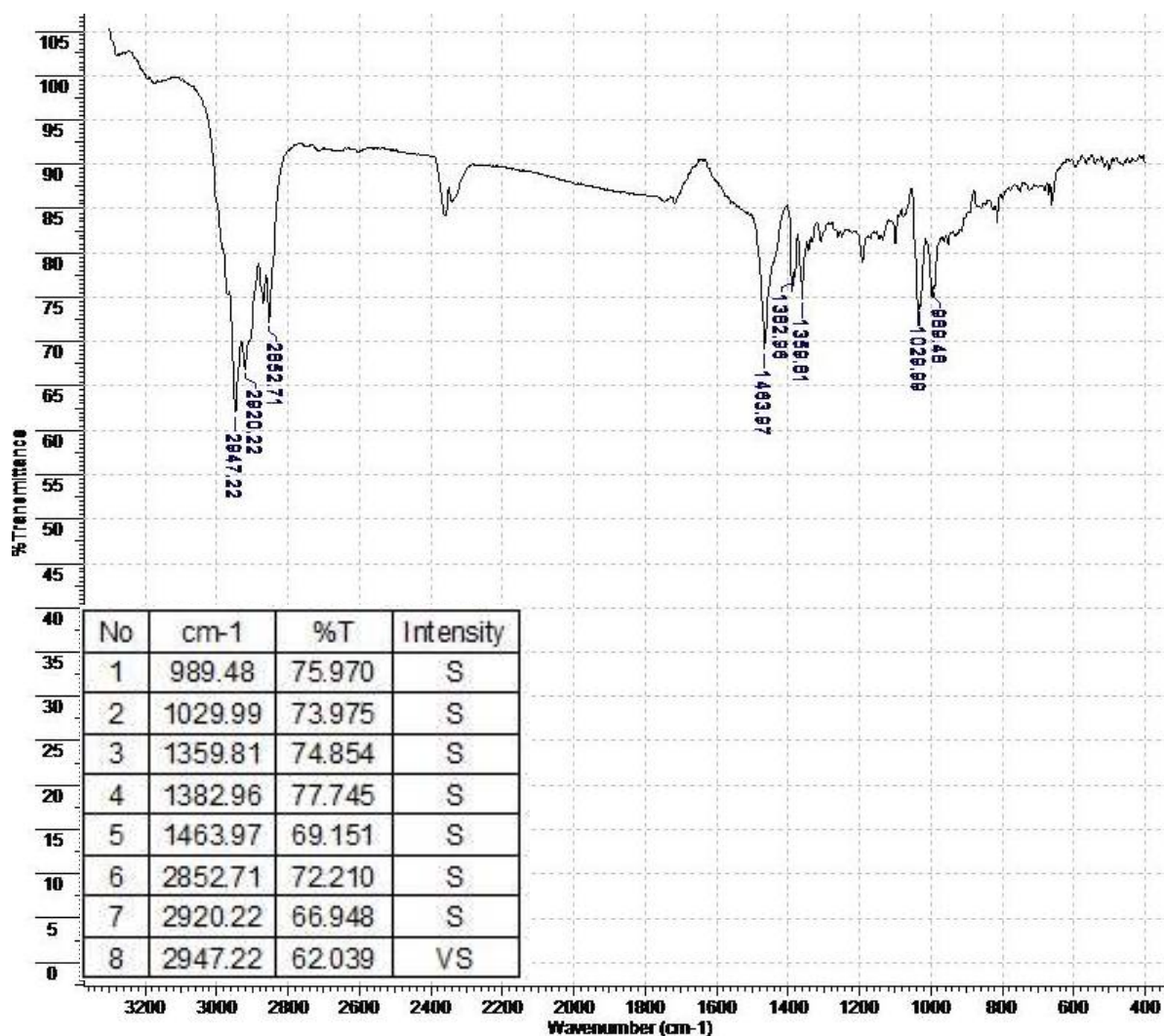


FIGURA 32. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO LA4D OBTIDO DA FRAÇÃO METANÓLICA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

O espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 33-35) apresentou uma grande quantidade de sinais na região de 0-2 δ dentre eles, vários singletos na região de 0,79 a 1,6 δ , que é característico dos triterpenoides, referente aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos presentes em sua estrutura. Em δ 3,23 foi observada a presença de um duplo dubleto, correspondente ao H-3, que geralmente é observado em triterpenos do tipo 3 β -OH. Em δ 5,12 e 5,18, observaram-se dois tripletos característicos de olefinas, correspondentes aos H-12 e H-13, respectivamente (MAHATO; KUNDU, 1994; NAGASAMPAGI, 2004).

O espectro de RMN- ^{13}C (FIGURAS 36-38) apresentou sinais em δ 79,0 atribuídos ao carbono carbinólico C-3. Na região de olefinas foram observados sinais em δ 145,2 e δ 121,7, correspondentes aos C-13 e C-12, respectivamente. Dois sinais caracterizam a β -amirina (1a), diferenciando-a da α -amirina (1b), uma vez que

nesta última estes sinais olefínicos são verificados em torno de δ 139,0 (C-13) e 124,0 (C-12). Os compostos α -amirina e β -amirina normalmente aparecem juntas como uma mistura. Neste estudo foi possível isolar β -amirina como componente majoritário, pois os sinais predominantes correspondem à mesma, sendo que aparece apenas um pequeno sinal da α -amirina. Os valores correspondentes aos carbonos da β -amirina, obtida da fração metanólica do extrato acetônico bruto podem ser observados na TABELA 3 (MAHATO; KUNDU, 1994; NAGASAMPAGI, 2004).

Embora seja uma substância bastante conhecida e comumente encontrada em plantas, não há relatos na literatura sobre a presença da β -amirina nesta espécie.

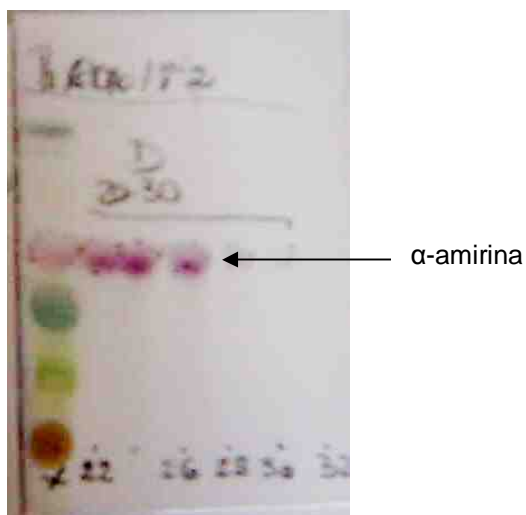


FIGURA 33. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO COMPOSTO LA4D ISOLADO DA FRAÇÃO METANÓLICA PROVENIENTE DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE. FASE MÓVEL: PetOAc 8:2.

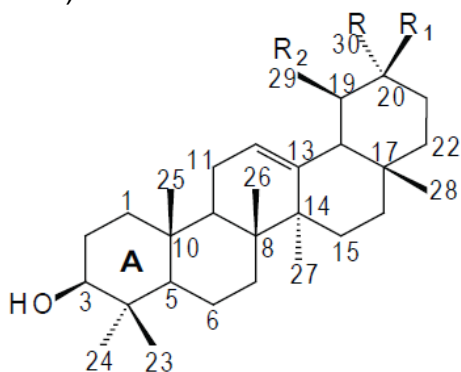
TABELA 3. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹³C E DEPT DE LA4D EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA A β-AMIRINA

CARBONO	LA4D ^a	DEPT ^a	β-amirina ^b	β-amirina ^c
1	38,6	CH ₂	38,7	38,5
2	26,9	CH ₂	27,3	27,0
3	79,0	CH	79,0	78,9
4	38,8	Cq	38,8	38,7
5	55,2	CH	55,3	55,1
6	18,4	CH ₂	18,5	18,3
7	32,6	CH ₂	32,8	32,7
8	39,8	Cq	38,8	39,7
9	47,6	CH	47,7	47,6
10	36,9	Cq	36,6	37,0
11	23,5	CH ₂	23,6	23,4
12	121,7	CH	121,8	121,7
13	145,2	Cq	145,1	145,0
14	41,7	Cq	41,8	41,7
15	26,1	CH ₂	26,2	26,2
16	27,2	CH ₂	27,0	27,3
17	31,1	Cq	32,5	32,5
18	47,2	CH	47,4	47,2
19	46,8	CH ₂	46,9	46,8
20	29,7	Cq	31,1	31,1
21	34,7	CH ₂	34,8	34,8
22	37,1	CH ₂	37,2	37,2
23	28,4	CH ₃	28,2	28,3
24	15,5	CH ₃	15,5	15,4
25	15,6	CH ₃	15,6	15,5
26	16,8	CH ₃	16,9	16,8
27	26,0	CH ₃	26,0	26,0
28	28,1	CH ₃	28,4	28,8
29	33,3	CH ₃	33,3	33,2
30	23,7	CH ₃	27,3	23,6

a-Dados experimentais (52 MHz, CDCl₃)b-MAHATO; KUNDU, 1994 (50 MHz, CDCl₃)

c-NAGASAMPAGI, 2004 (dados não informados)

Alguns estudos utilizando a α-amirina e β-amirina, obtidas da fração hexanoacetato de etila, já comprovaram atividade anti-inflamatória tópica, antitumoral, ansiolítica e antidepressiva (OTUKI *et al.*, 2005; ARAGÃO *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2007).

1a-R=R₂= CH₃-, R₁=H (α-amirina)1b-R=R₁= CH₃-, R₂=H (β-amirina)

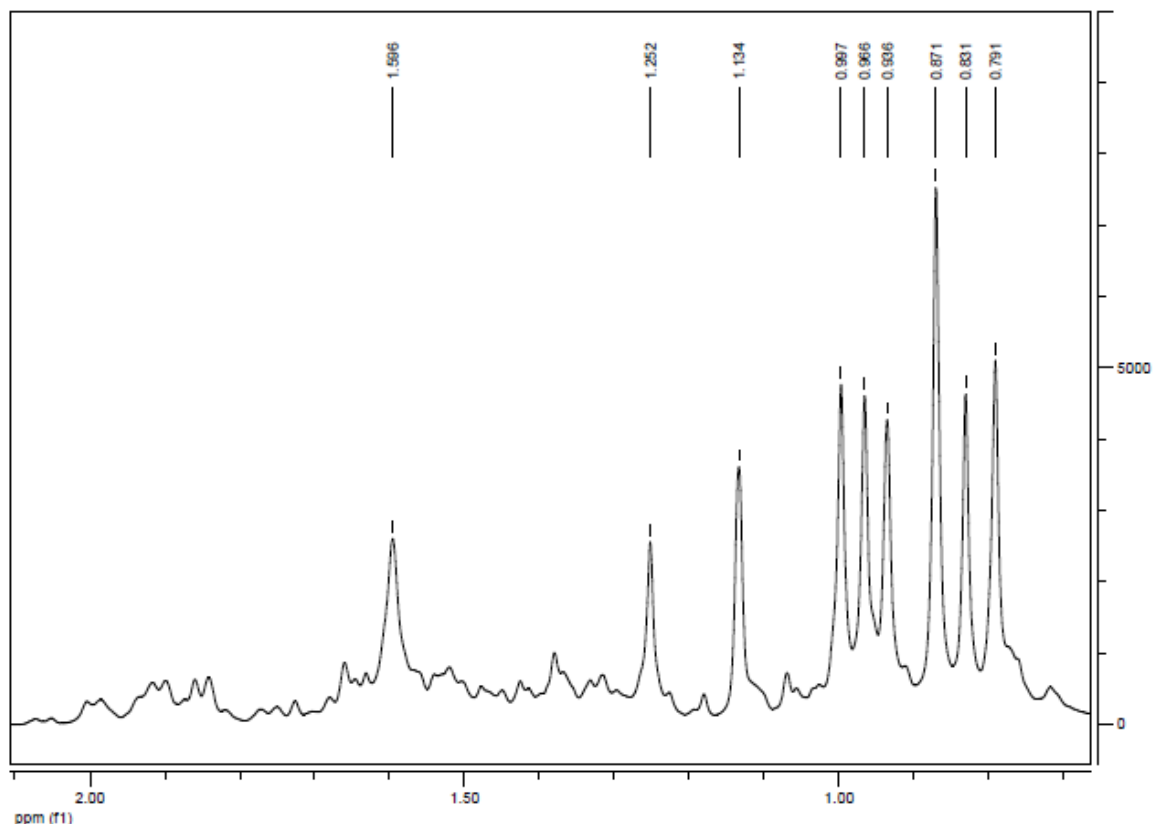


FIGURA 34. ESPECTRO DE RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA4D

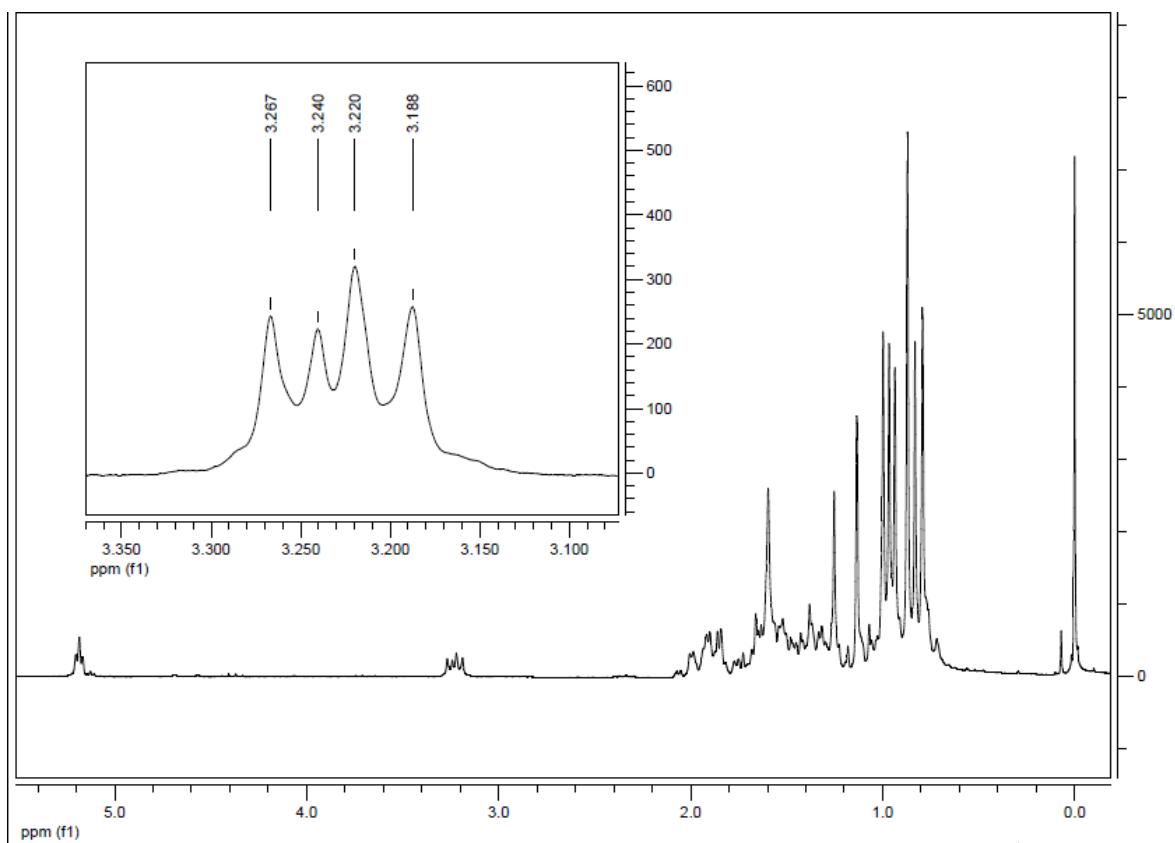
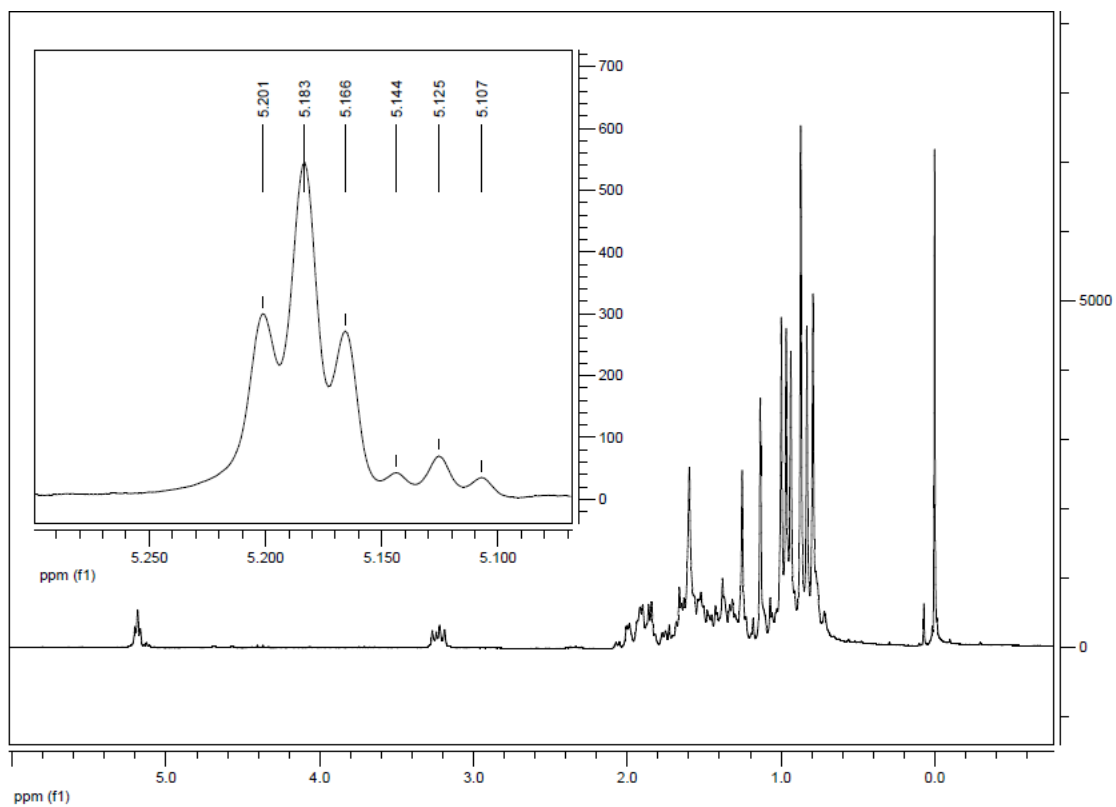


FIGURA 35. EXPANSÃO DA REGIÃO DE δ 3, 0 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA4D



FIGUR
A 36. EXPANSÃO DA REGIÃO DE δ 5,0 DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA4D

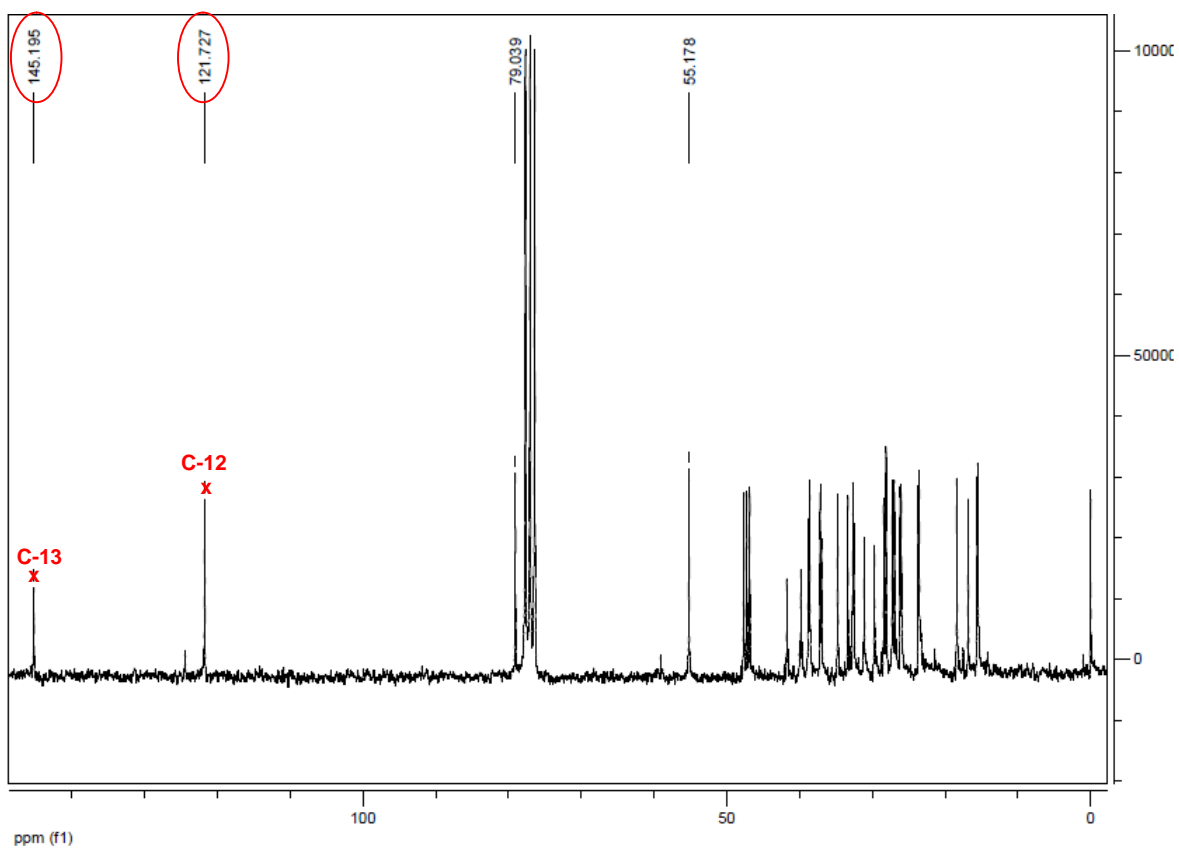


FIGURA 37. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DE LA4D

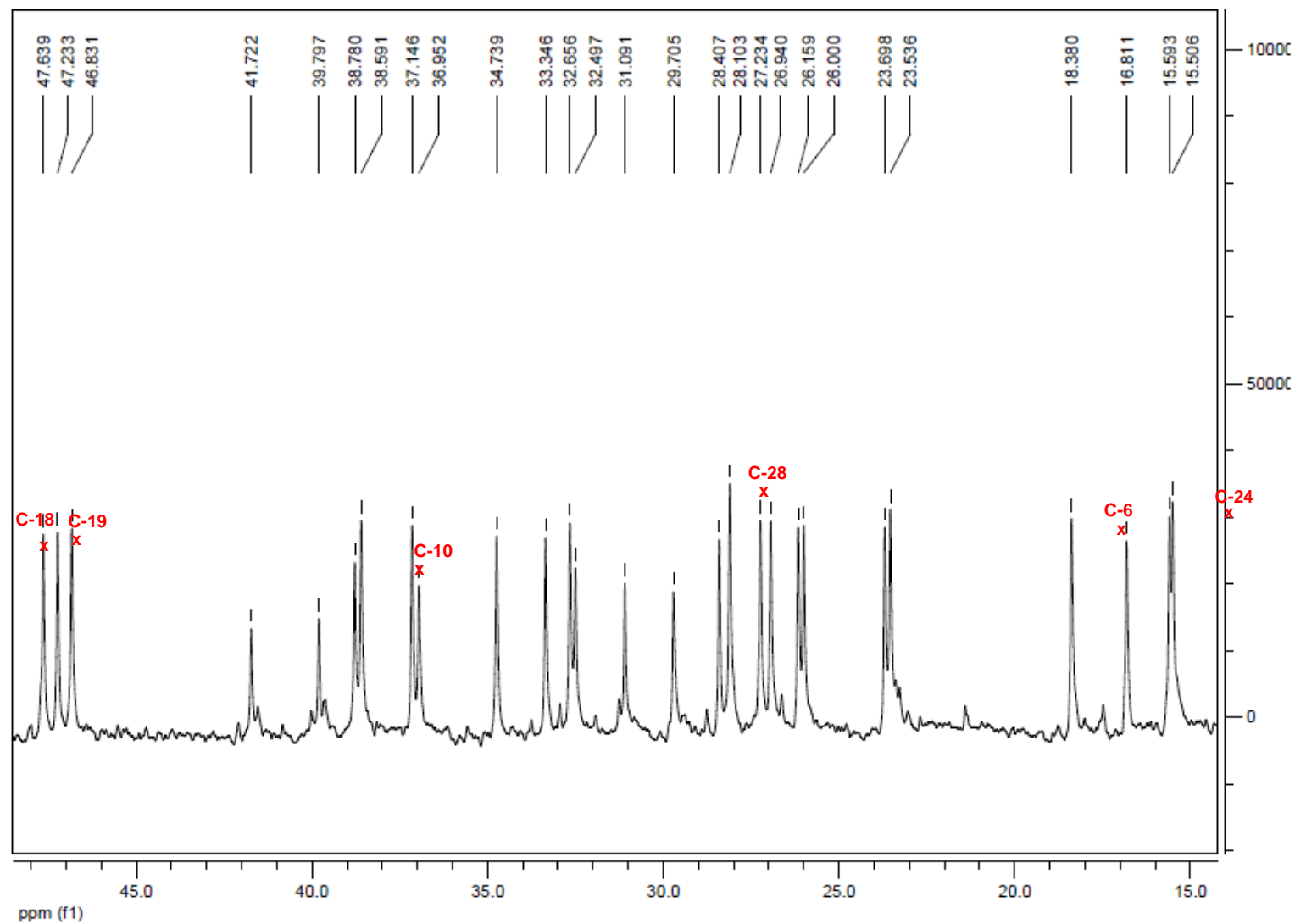


FIGURA 38. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) NA REGIÃO DE δ15 A 50 ppm DE LA4D

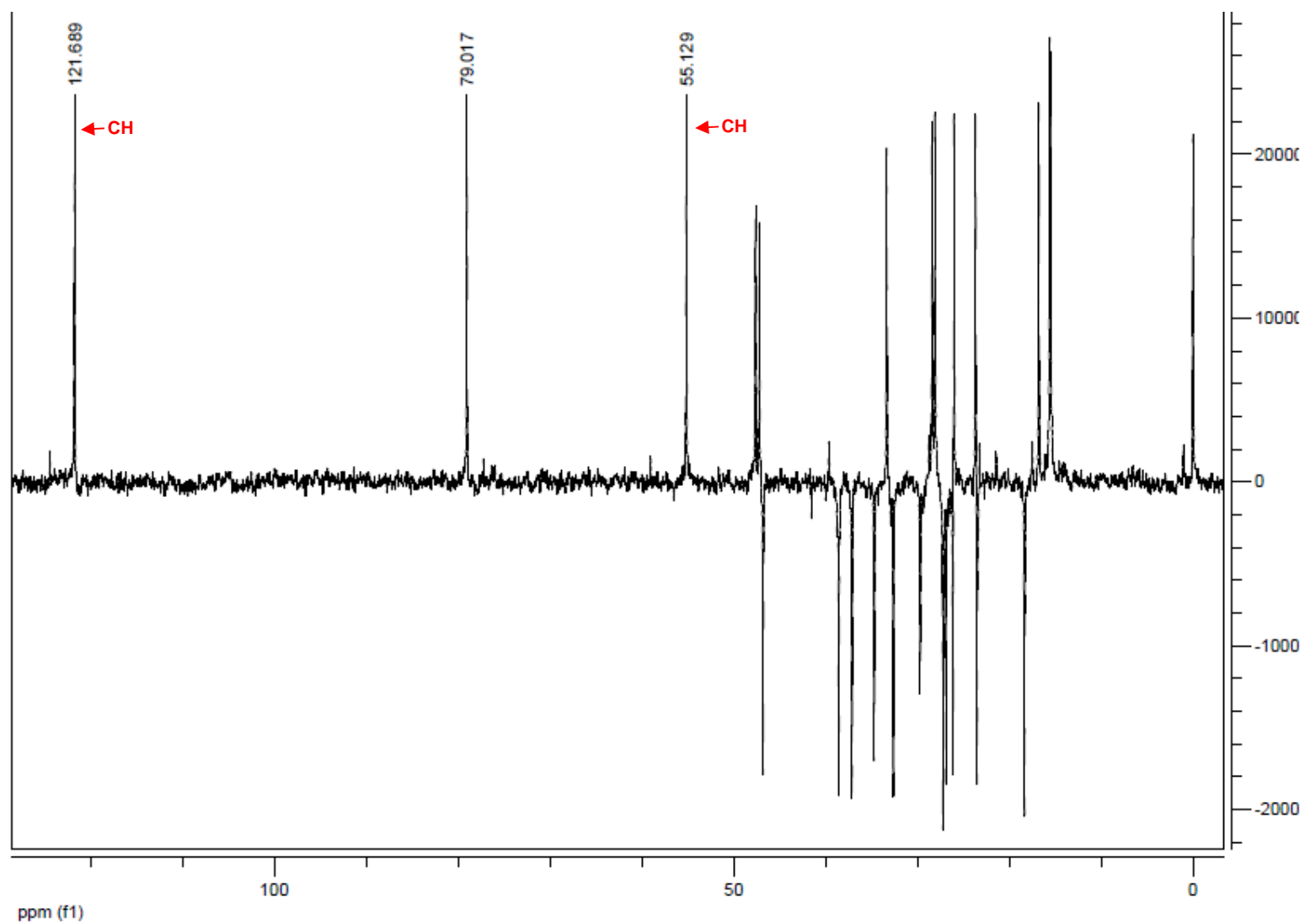


FIGURA 39. ESPECTRO DE RMN DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl₃) DE LA4D

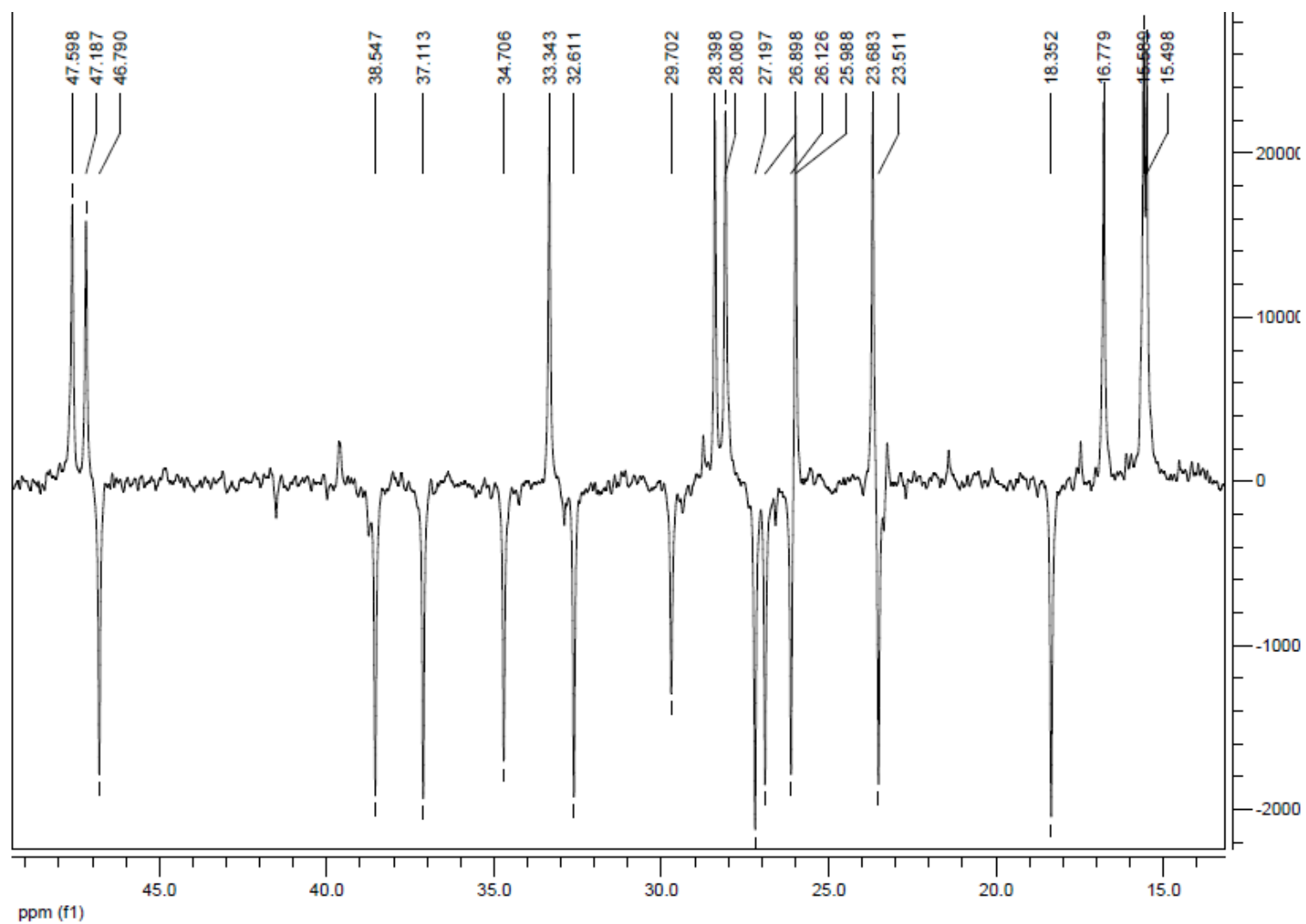


FIGURA 40. EXPANSÃO DE RMN DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) DE LA4D (δ E ppm), REGIÃO DE δ 15 A 50 ppm

Os espectros de absorção no IV dos compostos LA6A (307,8 mg) e LA7A (193,3 mg) constam das FIGURAS 33 e 34, respectivamente.

No espectro no IV, do composto LA6A, na região de 2953 a 2900 cm^{-1} foi possível observar bandas relativas aos grupamentos C-H, C-H₂ e C-H₃, de cadeias alifáticas. A região 1737 a 1700 cm^{-1} apresenta estiramentos indicativos de carbonila (C=O), a região de 1620 a 1500 cm^{-1} apresenta bandas relativas aos grupamentos C=C. A região de 1223 a 1161 cm^{-1} é indicativa de grupamentos C=O e C-O, sugerindo presença de carbonila de éster. A região de 670 cm^{-1} sugere deformação angular fora do plano de N-H (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

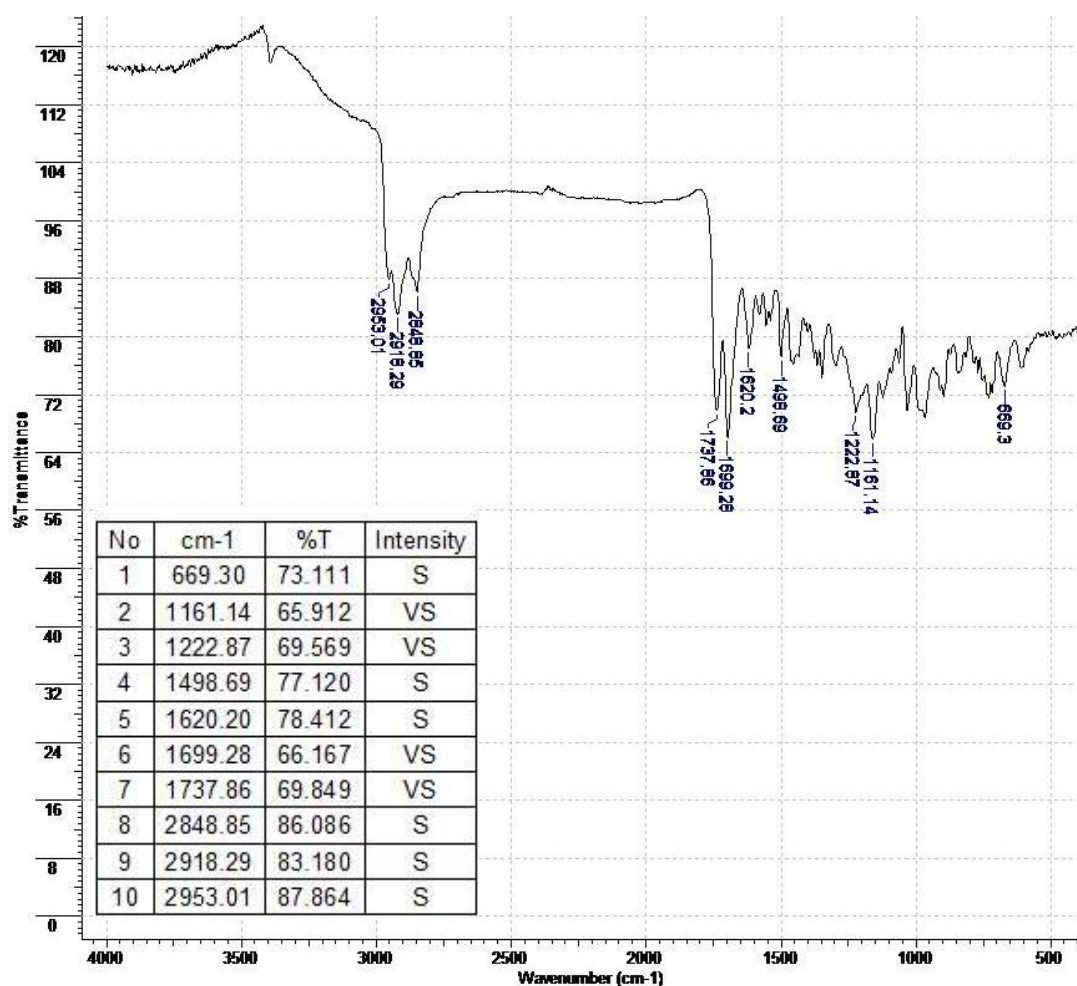


FIGURA 41. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO LA6A OBTIDO DA FRAÇÃO ACETÔNICA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

O espectro de IV da substância LA7A se assemelha ao do composto anterior. Na região de 2920 a 2848 cm^{-1} , podem ser observadas deformações axiais que indicam grupamentos C-H, C-H₂ e C-H₃. A região de 1736 a 1705 cm^{-1} apresenta deformações axiais indicativas de C=O, de cadeias alifáticas. A região de 1500 a 1460 cm^{-1} demonstra CH₂. A região de 1222 a 1160 cm^{-1} é característica de grupamentos C=O e C-O, sugerindo presença de carbonila de éster (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

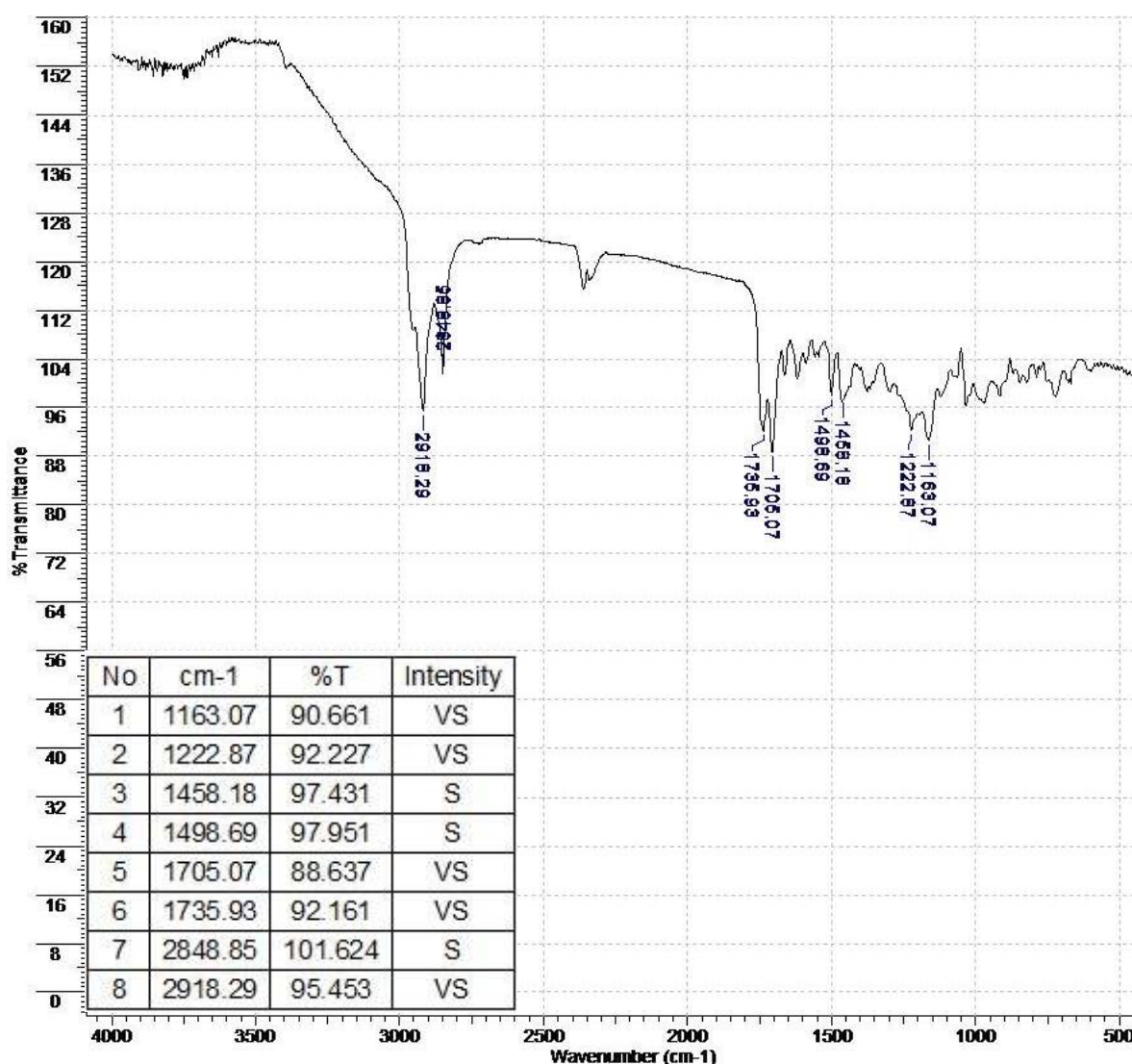


FIGURA 42. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO DO COMPOSTO LA7A OBTIDO DA FRAÇÃO ACETÔNICA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

TABELA 4. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹³C E DEPT DE LA6A E LA7A EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA FEOFITINA a E b

CARBONO	LA6A ^a	LA6A ^a DEPT	Feofitina a ^{b,c}	LA7A ^a	LA7A ^b DEPT	Feofitina b ^b
1	142,8	Cq	142,9	142,5	Cq	143,5
2	132,3	Cq	131,8	132,3	Cq	132,3
2 ¹	12,1	CH ₃	12,1	12,0	CH ₃	12,1
3	136,8	Cq	136,5	137,2	Cq	137,5
3 ¹	128,9	CH	129,0	128,6	CH	128,6
3 ²	123,1	CH ₂	122,8	123,6	CH ₂	123,3
4	138,0	Cq	136,2	137,2	Cq	136,9
5	97,5	CH	97,3	101,4	CH	101,5
6	150,3	Cq	155,5	150,8	Cq	151,0
7	132,2	Cq	136,1	132,5	Cq	132,5
7 ¹	11,2	CH ₃	11,2	187,5	CHO	187,1
8	160,3	Cq	145,2	158,8	Cq	158,8
8 ¹	17,3	CH ₂	19,7	18,9	CH ₂	18,5
8 ²	16,3	CH ₃	16,3	19,4	CH ₃	19,5
9	144,9	Cq	151,0	146,6	Cq	146,8
10	104,5	CH	104,4	106,8	CH	106,5
11	135,6	Cq	137,9	137,9	Cq	137,9
12	132,3	Cq	129,1	132,2	Cq	132,2
12 ¹	12,2	CH ₃	12,2	12,2	CH ₃	11,9
13	129,0	Cq	129,0	129,7	Cq	129,7
13 ¹	189,5	Cq	189,6	189,6	Cq	189,6
13 ²	64,7	CH	64,7	64,5	CH	64,7
13 ³	169,4	Cq	173,0	169,2	Cq	169,5
13 ⁴	52,9	CH ₃	53,0	53,0	CH ₃	53,0
14	150,3	Cq	150,0	150,8	Cq	150,8
15	105,8	Cq	105,2	105,0	Cq	105,1
16	162,4	Cq	161,3	164,2	Cq	164,0
17	51,3	CH	51,1	51,3	CH	51,5
17 ¹	31,2	CH ₂	29,8	31,9	CH ₂	31,3
17 ²	29,7	CH ₂	31,2	29,7	CH ₂	29,8
17 ³	173,0	Cq	172,0	174,0	Cq	174,0
18	50,2	CH	50,1	50,1	CH	50,0
18 ¹	22,6	CH ₃	22,7	22,6	CH ₃	23,1
19	172,7	Cq	170,0	172,8	Cq	173,0
20	94,1	CH	93,1	93,5	CH	93,1
*F1	61,5	CH ₂	61,5	61,5	CH ₂	61,0
F2	117,7	CH	117,8	117,6	CH	117,8
F3	142,3	CH	142,8	143,6	CH	142,8
F3 ¹	16,3	CH ₃	16,3	16,3	CH ₃	16,3
F4	39,8	CH ₂	39,8	39,8	CH ₂	39,8
F5	24,9	CH ₂	25,0	24,9	CH ₂	25,0
F6	36,6	CH ₂	36,6	36,6	CH ₂	36,6
F7	32,7	CH	32,8	32,7	CH	32,8
F7 ¹	19,6	CH ₃	19,6	19,6	CH ₃	19,6
F8	24,4	CH ₂	37,4	37,2	CH ₂	37,4
F9	37,3	CH ₂	24,4	24,4	CH ₂	24,4
F10	37,3	CH ₂	37,3	37,2	CH ₂	37,3
F11	32,6	CH	32,6	32,6	CH	32,6
F11 ¹	19,5	CH ₃	19,7	19,3	CH ₃	19,7
F12	39,3	CH ₂	24,8	39,3	CH ₂	24,8
F13	24,7	CH ₂	37,3	24,7	CH ₂	37,3
F14	29,7	CH ₂	39,4	29,7	CH ₂	39,4
F15	27,9	CH	27,9	27,9	CH	27,9
F15 ¹	28,0	CH ₃	22,7	26,6	CH ₃	22,7
F16	23,1	CH ₃	22,6	22,7	CH ₃	22,6

a-Dados experimentais (50 MHz, CDCl₃)- Dep. de Química UFPR.

b- SCHWIKKARD *et al.*, 1998 (125 MHz)

c- SOUZA, 2009 (125 MHz)

* F= referente aos carbonos da cadeia fitilica

TABELA 5. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹H DE LA6A COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA FEOFITINA a

H	LA6A ^a	LA6A ^{a1}	Feofitina a ^{b,c}
H-10	9,61 (s)	9,50 (s)	9,50 (s)
H-5	9,45 (s)	9,34 (s)	9,36 (s)
H-20	8,67 (s)	8,55 (s)	8,55 (s)
H-3 ¹	7,97 (dd) (J= 17,8 Hz e 11,6 Hz)	7,96 (dd)	7,98 (dd) (J= 15,19 Hz e 11,39 Hz)
H-3 ²	6,31 (dd) (J=14,4 Hz e 2 Hz)	6,30 (dd) (J=12,0 Hz)	6,28 (dd) (15,19 Hz e 2,29 Hz)
H-13 ²	6,24 (d)	6,26	6,26 (s)
H-3 ²	6,17 (dd) (J=10 Hz)	6,18 (dd) (J=12,0 Hz)	6,17 (dd) (11,39 Hz e 2,28 Hz)
F2	5,13	5,11	5,10
F1	4,36	4,00	4,00
H-18	4,49 (t)	4,49 (t)	4,45 (m)
H-17	3,89 (s)	3,88 (s)	4,20 (m)
H-13 ⁴	3,83 (s)	3,81 (s)	3,88 (s)
H-12 ¹	3,68 (s)	3,65 (s)	3,66 (s)
H-2 ¹	3,41 (d)	3,39	3,39
H-7 ¹	3,22 (s)	3,21 (s)	3,21 (s)
H-18 ¹	1,82 (d) (J=6,0 Hz)	1,81 (d) (J=9,0 Hz)	1,80 (d) (7,59 Hz)
H-8 ²	1,68 (t)	1,79 (t)	1,68 (t)
F6	0,86 (d) (J=6,6 Hz)	0,87 (J=3,0 Hz)	0,85
F12	0,85	0,86	0,85
F15 ¹	0,83	0,83	0,80
F16	0,75	0,78	0,79
F11	0,72	0,66	0,76

a-Dados experimentais (200 MHz, CDCl₃)- Dep. de Química UFPR.a¹-Dados experimentais (300 MHz, CDCl₃)- Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (Novara)-Itáliab- SCHWIKKARD *et al.*, 1998 (125 MHz)

c- SOUZA, 2009 (125 MHz)

* F= referente aos carbonos da cadeia fitilica

TABELA 6. DADOS DO ESPECTRO DE RMN-¹H DE LA7A COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA FEOFITINA b

H	LA7A ^a	LA7A ^{a1}	Feofitina b ^{b,c}
H-7 ¹	11,01 (s)	11,09 (s)	11,07 (s)
H-5	10,23 (s)	10,33 (s)	10,28 (s)
H-10	9,50 (s)	9,53 (s)	9,57 (s)
H-20	8,55 (s)	8,55 (s)	8,55 (s)
H-3 ¹	7,97 (dd) (J=6,00 Hz e 10,00 Hz)	7,97 (dd) (J=6,00 Hz)	7,98 (dd) (J=15,19 Hz e 11,39 Hz)
H-3 ²	6,30 (dd) (J=16,00 Hz)	6,55 (dd)	6,35 (dd) (J=15,19 Hz)
H-3 ²	6,25 (dd) (J=12,00 Hz e 10 Hz)	6,20 (dd)	6,20 (dd) (J=11,39 e 2,28 Hz)
H-13 ²	6,19 (dd)	6,11 (dd)	6,20 (dd)
F2	4,52 (t)	5,14 (t)	4,00 (t)
H-18	4,49 (m)	4,57 (m)	4,45 (m)
H-17	4,36 (m)	4,00 (m)	4,15 (m)
H-13 ⁴	3,92 (s)	3,91 (s)	3,88 (s)
H-12 ¹	3,64 (s) (J=4,00 Hz)	3,40 (s) (J=6,00 Hz)	3,66 (q) (J=8,35 Hz)
H-2 ¹	3,37 (s)	3,21 (s)	3,39 (s)
H-18 ¹	1,82 (s)	2,12 (s)	1,80 (s) (J=7,59 Hz)
H-8 ²	1,25 (s)	1,47 (s)	1,68 (t) (J=8,35 Hz)
F6	0,85 (m)	1,25 (m)	1,10 (m)
F12	0,82 (s)	0,87 (m)	0,85 (m)
F15 ¹	0,81 (d)	0,86 (d)	0,85 (d)
F16	0,76 (d)	0,67 (d)	0,79 (d)
F11	0,73 (m)	0,50 (m)	0,76 (m)

a-Dados experimentais (200 MHz, CDCl₃)- Dep. de Química UFPR.a¹-Dados experimentais (300 MHz, CDCl₃)- Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche (Novara)-Itáliab- SCHWIKKARD *et al.*, 1998 (125 MHz)

c- SOUZA, 2009 (125 MHz)

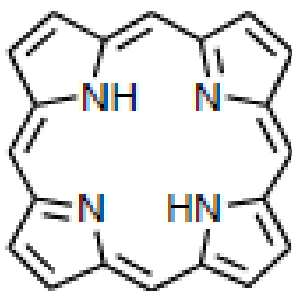
* F= referente aos carbonos da cadeia fitilica

A análise de RMN- H^1 foi feita em dois equipamentos com frequências diferentes. Os valores de δ foram avaliados em frequência de 200 MHz e em frequência de 300 MHz. Não foram observadas diferenças relevantes entre os dois resultados, uma vez que os sinais ficaram muito próximos.

Os espectros de RMN- H^1 (FIGURAS 43, 44) de LA6A apresentaram singletos em δ H 9,50, 9,34 e 8,55, os quais correspondem aos hidrogênios olefínicos H-10, H-5 e H-20, características atribuídas a compostos que contêm cadeias porfirínicas. Outros sinais característicos de cadeias porfirínicas são a presença de duplo-dublete em δ 7,96 juntamente com outro dublete em δ 6,26 e duplo-dublete em δ 6,18, os quais pertencem aos hidrogênios vinílicos do grupo vinila, inseridos na posição 3 (H-3¹ e H-3²), respectivamente. A presença de singletos (FIGURA 45) em δ H 3,65, 3,39 e 3,21, que se referem aos hidrogênios H-12¹, H-2¹ e H-7¹, este último corresponde ao R1 e todos são metilas olefínicas. (SCHWIKKARD; MULHOLLAND; HUTCHINGS, 1998; HUANG *et al.*, 2007).

As clorofilas são compostos capazes de realizar a fotossíntese, derivados das porfirinas e formados por quatro anéis pirrólicos (2) e um quinto anel isocíclico, tendo como átomo central o magnésio (Mg). Existem cerca de 10 clorofilas isoladas e identificadas, sendo que as mais abundantes em ordem crescente são: clorofila *a*, clorofila *b*, que difere da primeira pela variação no anel pirrólico II, clorofila *c* (*c*1 e *c*2), clorofila *d*, estas duas encontradas em algas e protoclorofila. A bacterioclorofila é encontrada em bactérias fotossintetizantes (DOLPHIN, 1978; SCHWARTZ, LORENZO, 1990).

De acordo com Shioi *et al.* (2005), a degradação da clorofila ocorre sempre que as folhas mudam de cor, por meio de dois tipos de mecanismos: o tipo I, em que se perdem o fitol, o Mg^{2+} e algumas cadeias laterais da molécula, e o tipo II, em que ocorre a fragmentação oxidativa do anel tetrapirrólico. O Mg^{2+} e o fitol são removidos por duas enzimas que se chamam clorofilase e Mg-dequelatase, dando origem às feofitinas e aos cloroforbídeos. Estes sofrem ação da segunda enzima citada e originam os feoforbídeos, sendo os últimos catabólitos intermediários de coloração verde na reação e também caracterizados pela presença de ácido propiônico no C-17 (THOMAS; OUGHAM; HÖRTENSTEINER, 2001; MARQUEZ-LANFER, 2003).



2

A diferença entre compostos porfirínicos está no R1 (3), em que se pode observar presença de metila (CH_3) para clorofila *a* e derivados e presença de CHO para clorofila *b* e derivados. O valor de próton encontrado para esse radical foi δ H 3,21, indicando que este pertence a um derivado *a* (SCHWIKKARD; MULHOLLAND; HUTCHINGS, 1998; BORMANN, 2009).

A presença de vários sinais na região de metilas alifáticas de δ H 0,87-0,66 (FIGURA 44), correspondentes a CH, CH_2 e CH_3 , indica que a molécula possui um derivado fitil (3), concluindo-se que se trata de uma feofitina *a*. A presença de um tripleto em δ H 3,89, de um dubleto em δ H 3,39 e de um singleto em δ H 5,11, que correspondem à H-17, H-F1 e H-F2, confirmam a presença do derivado fitil.

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURAS 46, 49) e as expansões (FIGURAS 47, 48, 50) apresentaram 55 sinais que correspondem a um composto derivado porfirínico e 20 sinais que correspondem ao grupo fitil. Entre os sinais observados estão δ C 104,5, 97,5 e 94,1 referentes aos carbonos C-10, C-5 e C-20 do esqueleto carbônico do núcleo porfirínico. Verificou-se também a presença de sinais que correspondem aos carbonos vinílicos em δ C 129,0 e 123,1, C-13 e C-3², respectivamente. Os sinais δ C 12,2, 12,1 e 11,2 referem-se aos carbonos C-12¹, C-2¹ e C-7¹, indicativos de três metilas. Sinais em δ C 61,5, 117,7 e 142,3 correspondem aos carbonos do grupo fitil F1, F2 e F3.

O sinal de δ C 189,5 representa a carbonila da cetona no carbono C-13¹. Em δ C 64,7 (C-13²), ocorre um carbono metínico não hidroxilado.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C constam das TABELAS 4 e 5.

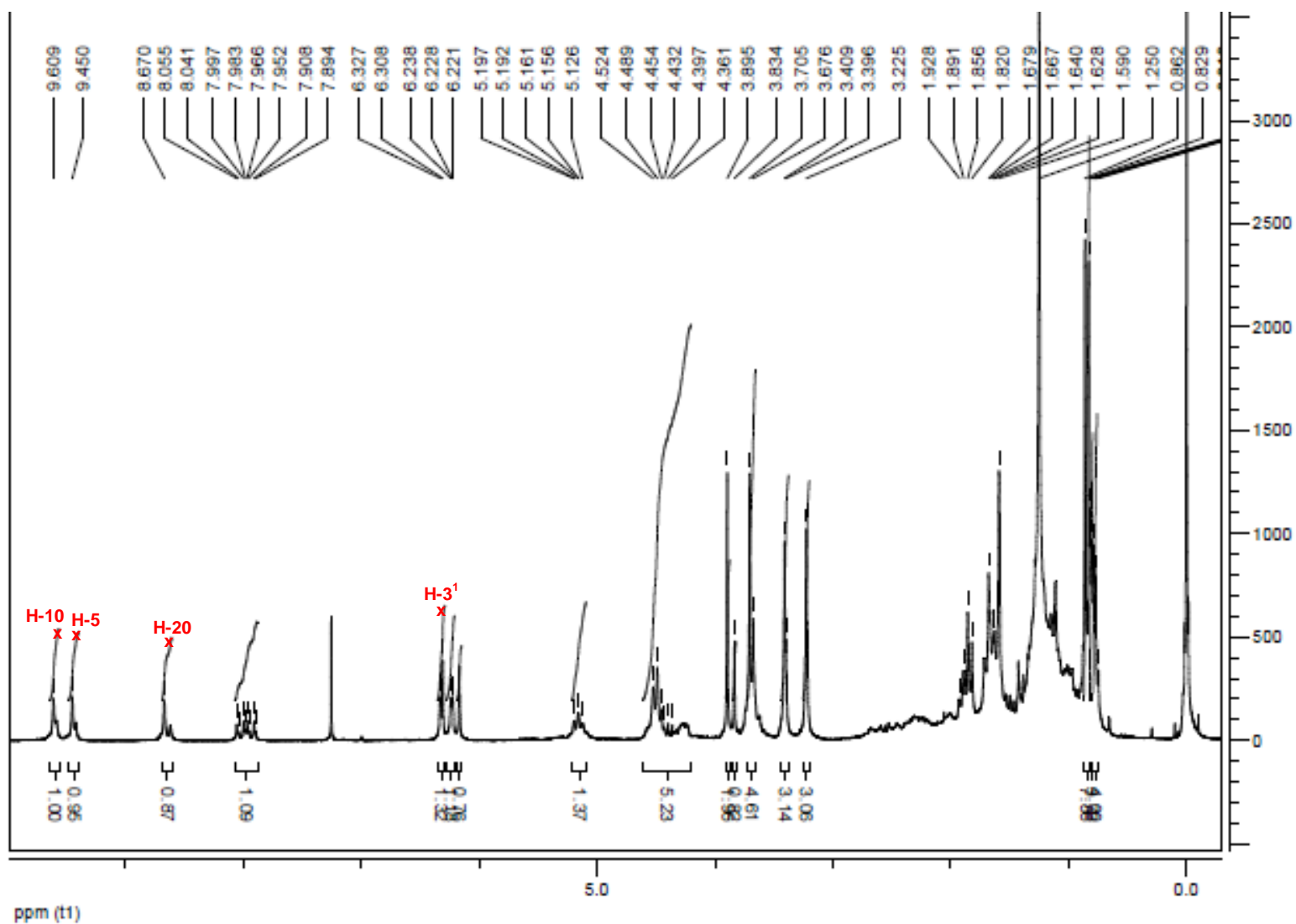


FIGURA 43. ESPECTRO GERAL DE RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA6A (δ E ppm)

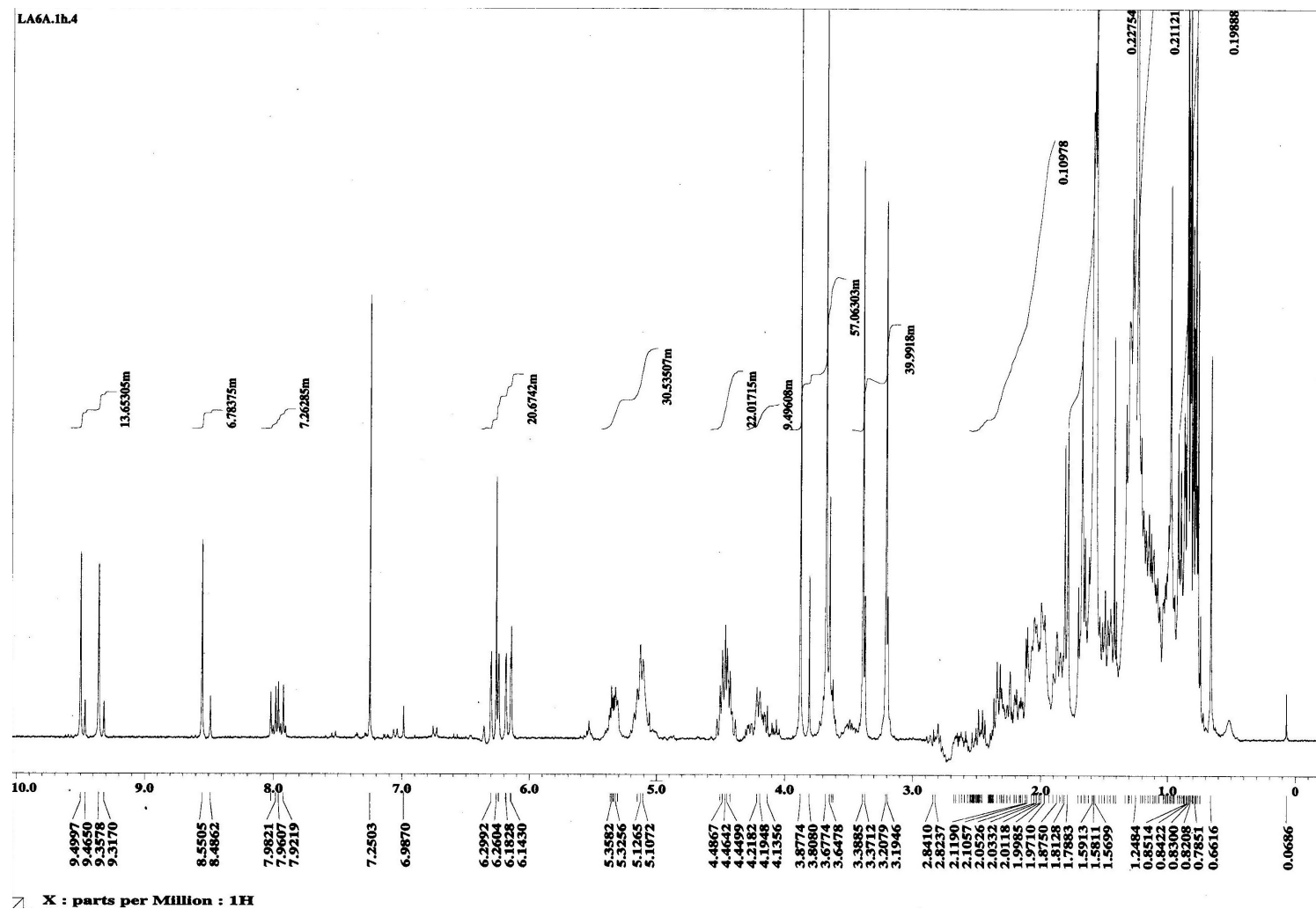


FIGURA 44. ESPECTRO GERAL DE RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) DE LA6A (δ E ppm)

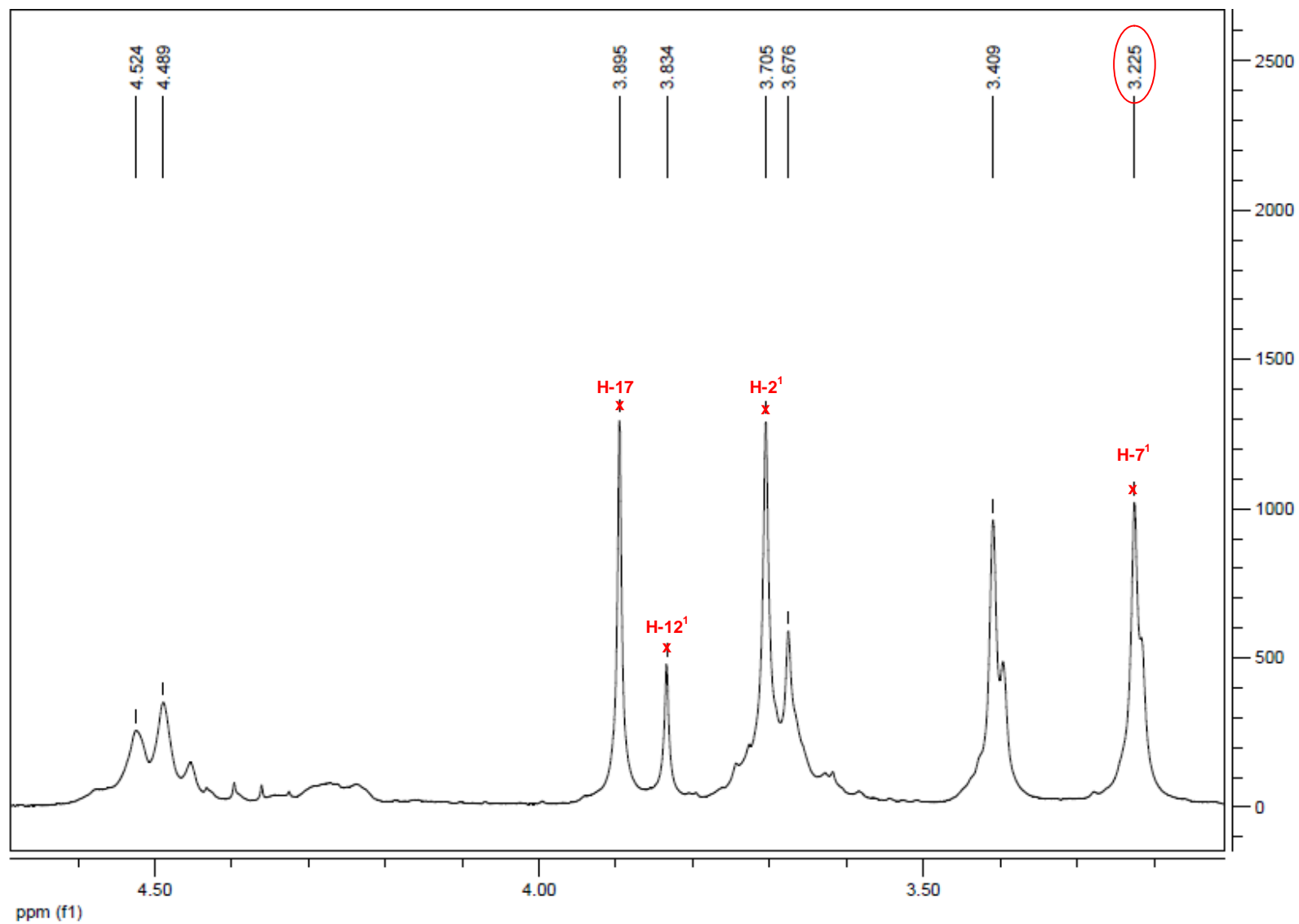


FIGURA 45. EXPANSÃO DA REGIÃO (3,22 A 4,54 ppm) DO ESPECTRO DE RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA6A

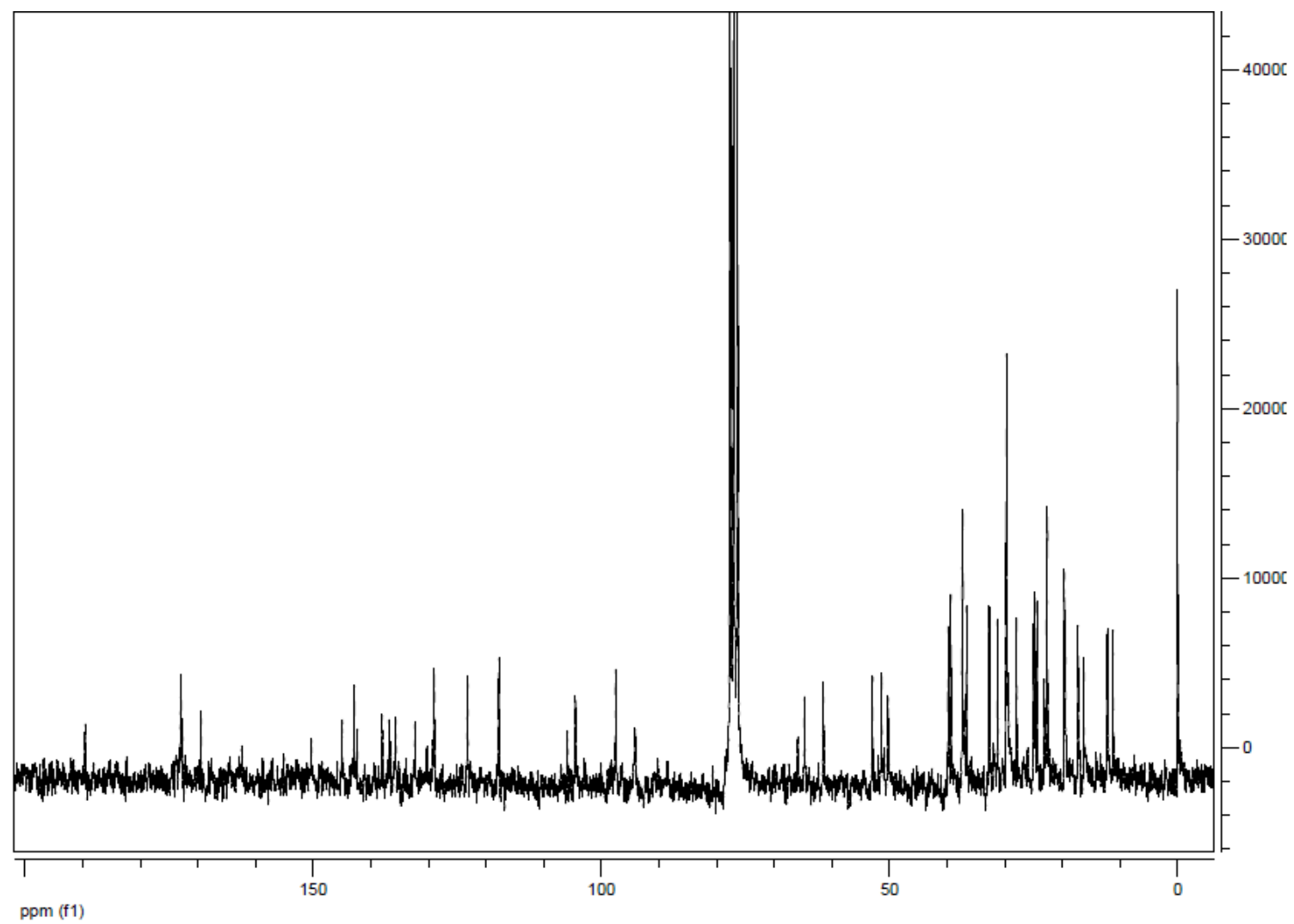


FIGURA 46. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DE LA6A

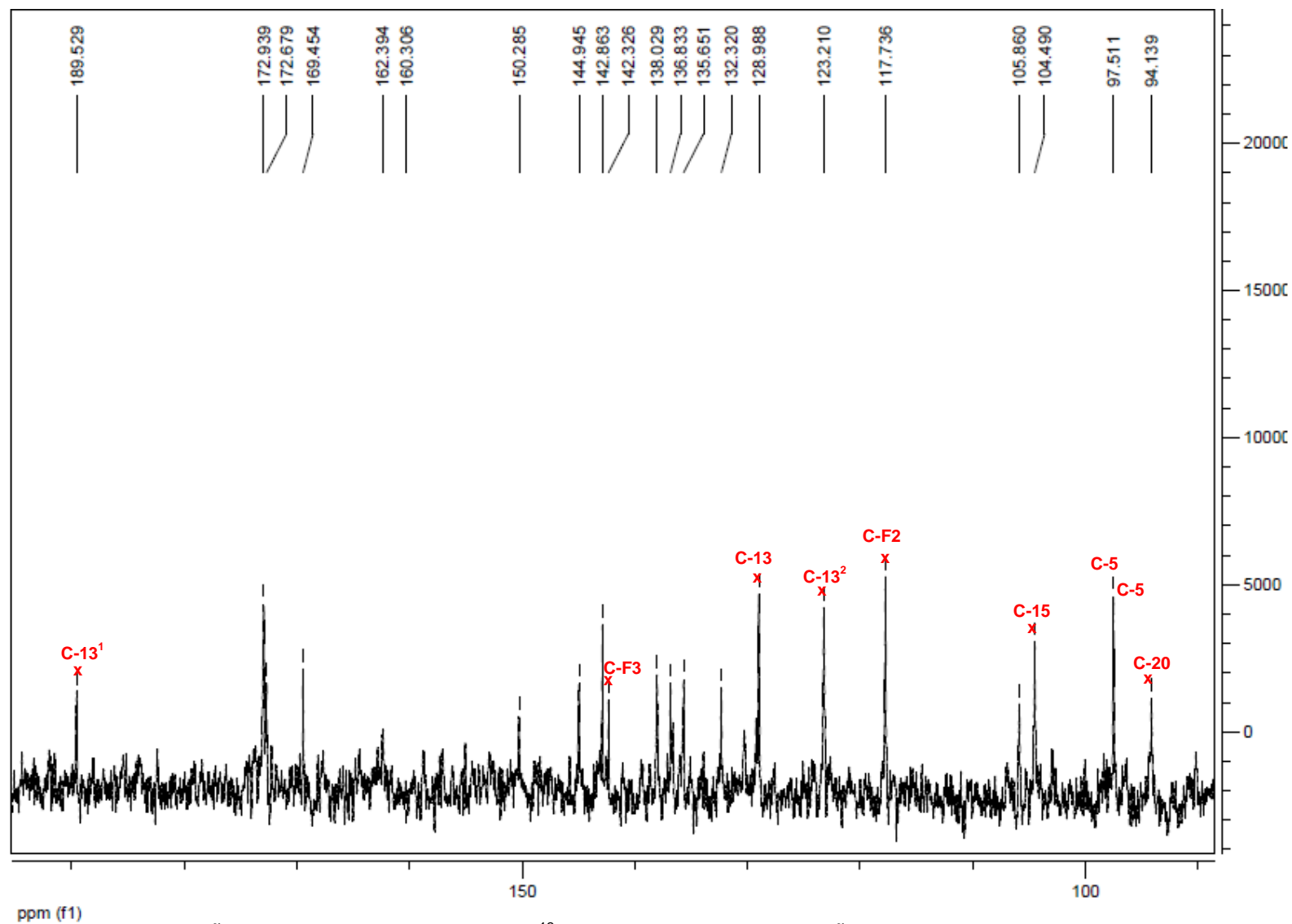


FIGURA 47. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) NA REGIÃO DE δ 90-200 PPM DE LA6A

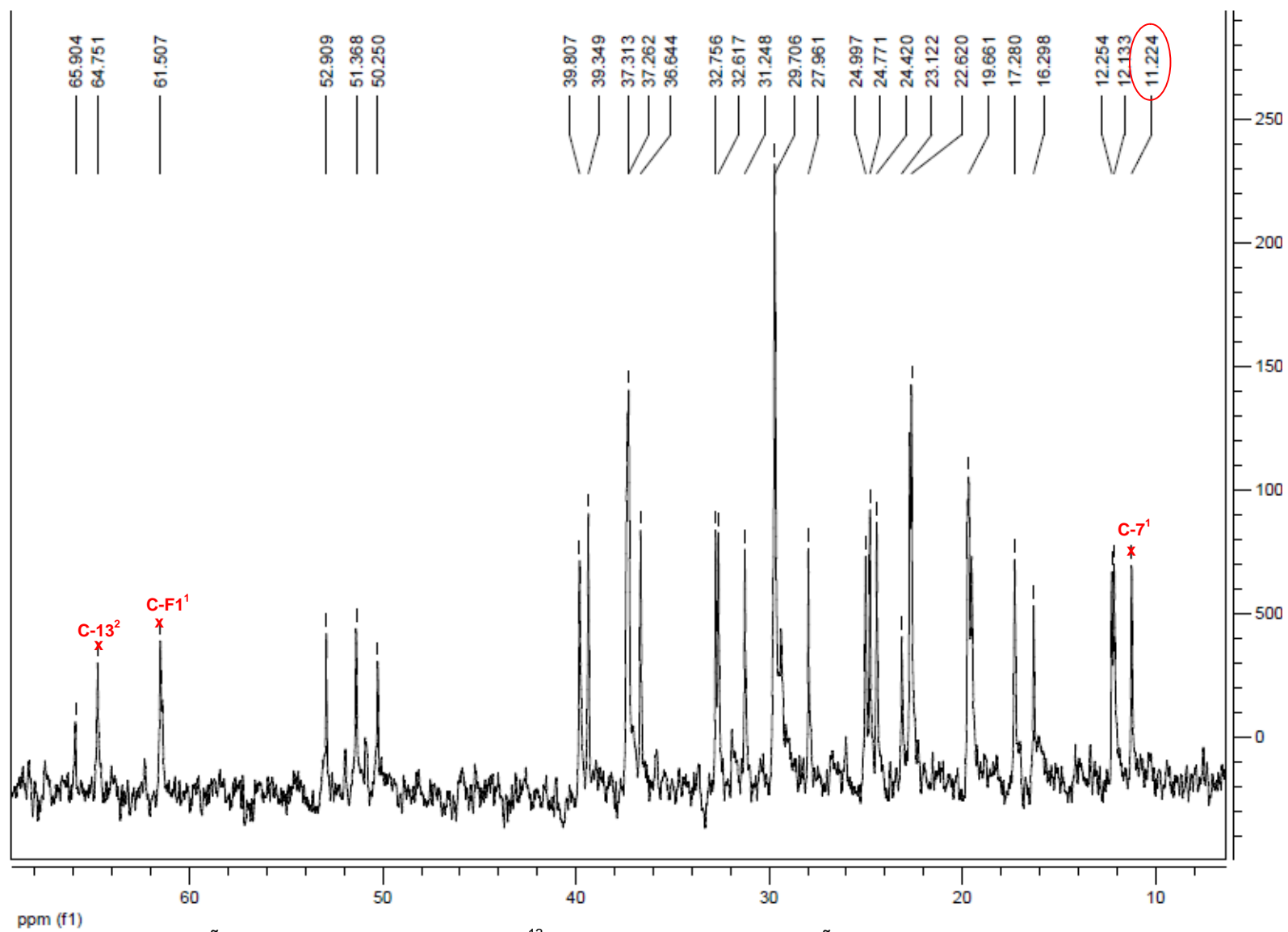


FIGURA 48. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) NA REGIÃO DE δ 10-70 PPM DE LA6A

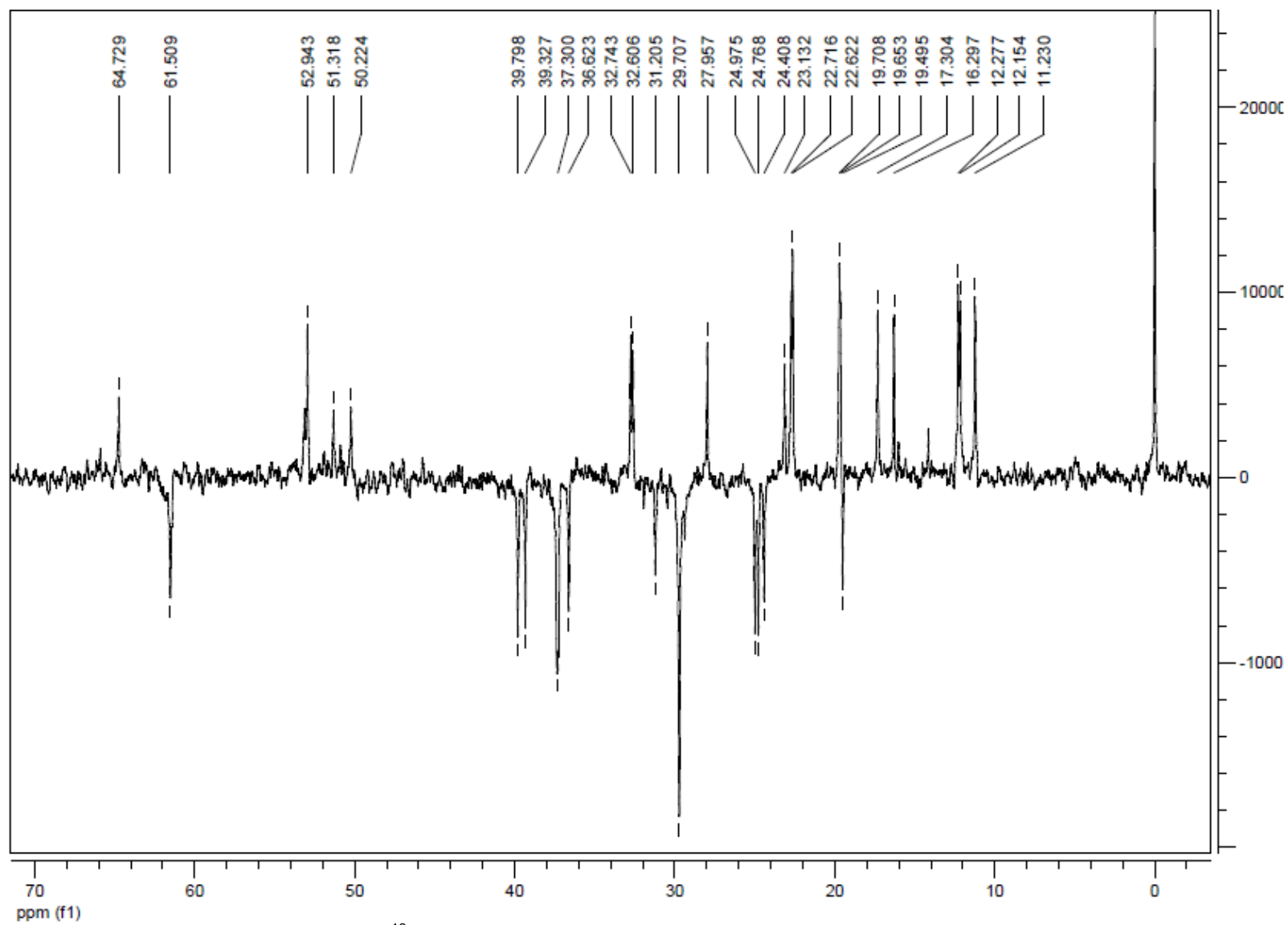


FIGURA 49. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) DE LA6A

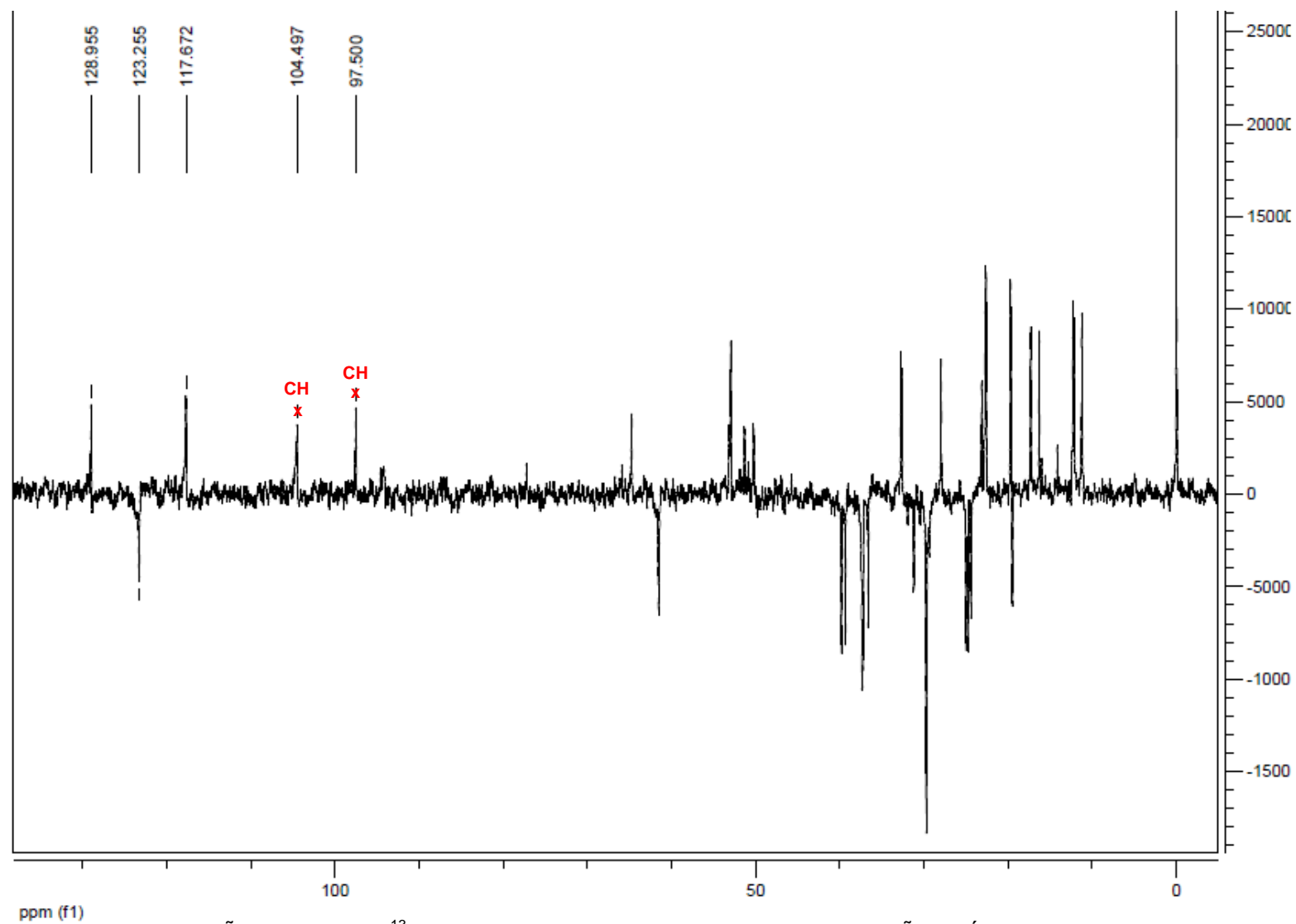


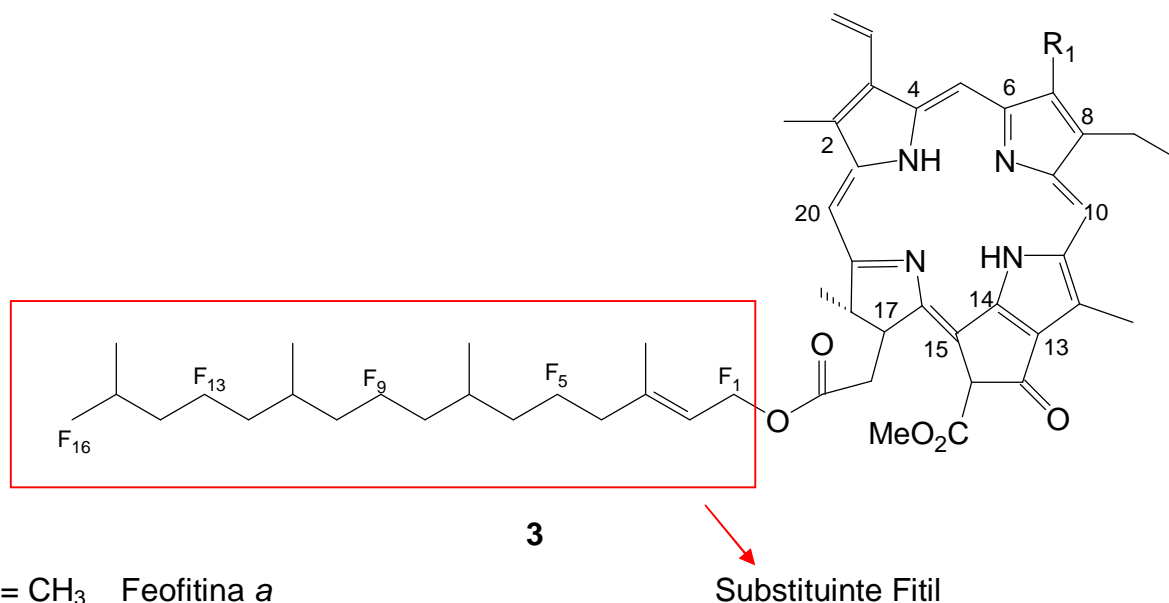
FIGURA 50. EXPANSÃO DE RMN DE ^{13}C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) DE LA6A, REGIÃO ATÉ 130 ppm

Os espectros de RMN- H^1 (FIGURAS 51, 52) de LA7A apresentam características de compostos que possuem núcleo porfirínico, com a presença de singletos em δH 10,33, 9,53 e 8,55, os quais correspondem aos hidrogênios olefínicos H-5, H-10 e H-20. Outros sinais característicos de cadeias porfirínicas são a presença de duplo-dublete em 7,97 juntamente com outro duplo-dublete em 6,55 e um duplo-dublete em 6,20, os quais pertencem aos hidrogênios vinílicos do grupo vinila, inseridos na posição 3 (H-3¹, H-3² e H-3³), respectivamente, e três singletos em δH 3,40 e 3,21 que se referem aos hidrogênios H-12¹, H-2¹, que correspondem a metilas olefínicas.

Características de derivados porfirínicos do tipo *b* demonstram ausência de metila em H-7¹, onde aparece um sinal em aproximadamente δH 11,0, que é o hidrogênio pertencente ao grupo aldeído (FIGURA 53). Devido a essa característica foi possível comparar os dois compostos e diferenciá-los quanto a *a* e *b* (RISCH; BROCKMANN, 1983; SCHWIKKARD; MULHOLLAND; HUTCHINGS, 1998).

Em δH 5,14, pode-se observar um tripleto e no sinal δH 6,11 um duplo-dublete pertencente ao δH - 13², respectivamente, caracterizam derivados porfirínicos.

O espectro de RMN- ^{13}C (FIGURAS 54, 56) e as expansões (FIGURAS 54, 55, 57, 58) apresentaram 55 sinais, entre os quais δC 106,8, 101,4 e 93,5 que dizem respeito aos carbonos C-10, C-5 e C-20 do esqueleto carbônico do núcleo porfirínico. Verificou-se também a presença de sinais que correspondem aos carbonos vinílicos em δC 128,6 e 123,6, C-3¹ e C-3², respectivamente. Os sinais δC 12,4, 12,1 referem-se aos carbonos C-12¹, C-21, e δC 187,5, referente ao C-7¹, pertencente ao grupo aldeído, caracteriza um composto do tipo *b* (RISCH; BROCKMANN, 1983; SCHWIKKARD; MULHOLLAND; HUTCHINGS, 1998; HUANG *et al.*, 2007).



R1= CH₃ Feofitina *a*

R1= CHO Feofitina *b*

Os compostos LA6A e LA7A representam uma mistura, porém, de acordo com os espectros foi possível observar a predominância de sinais em ambos, como em LA6A predominam os sinais de feofitina *a* e no composto LA7A, predominam sinais de compostos de feofitina *b*.

As clorofilas, por serem pigmentos fotossintéticos, são utilizadas na alimentação como corantes e também como antioxidante. Na indústria farmacêutica elas aparecem fazendo parte de cosméticos, produtos de higiene e limpeza (MA; DOLPHIN, 1999; SHOEFS, 2002).

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C constam das TABELAS 4 e 6.

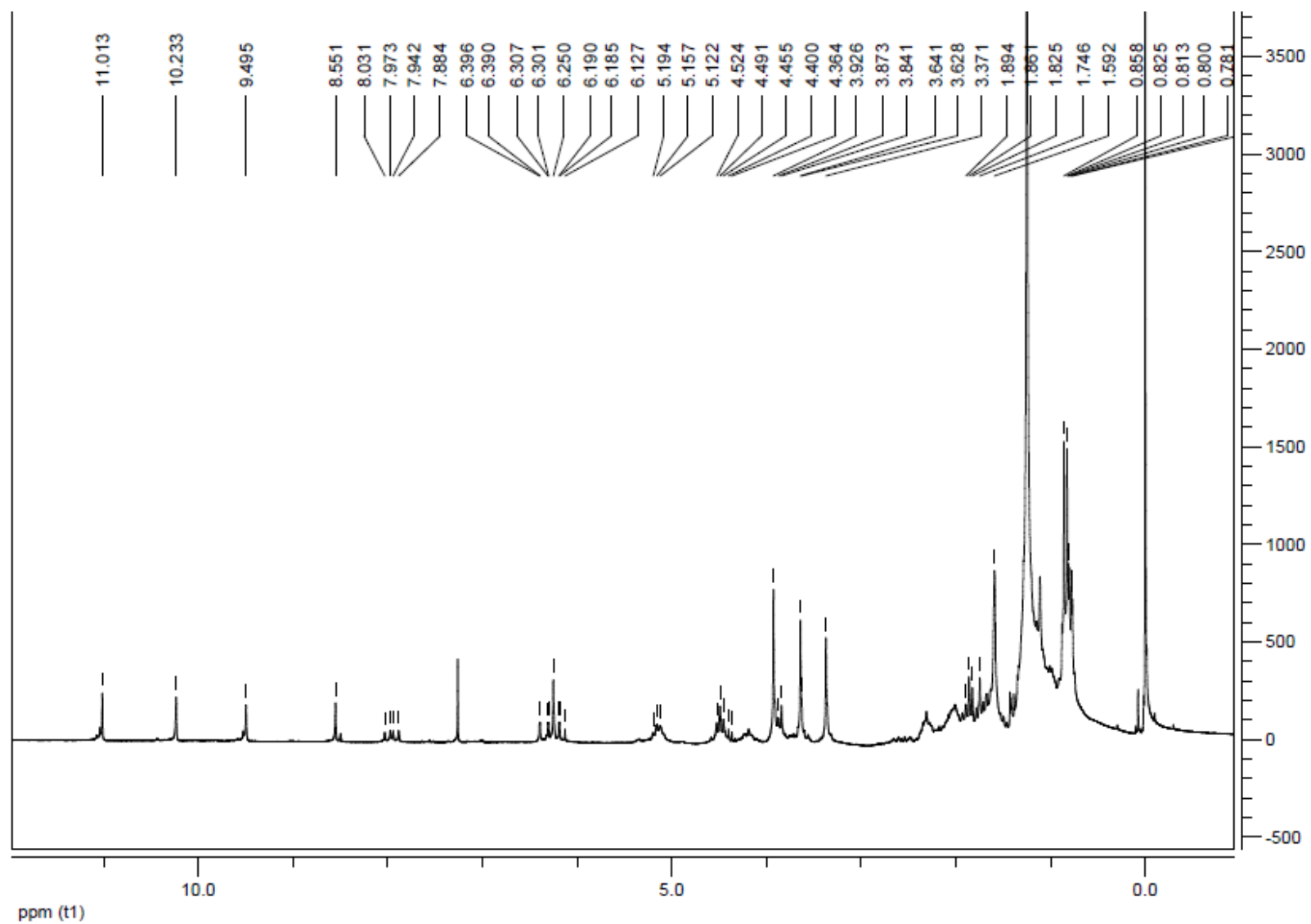
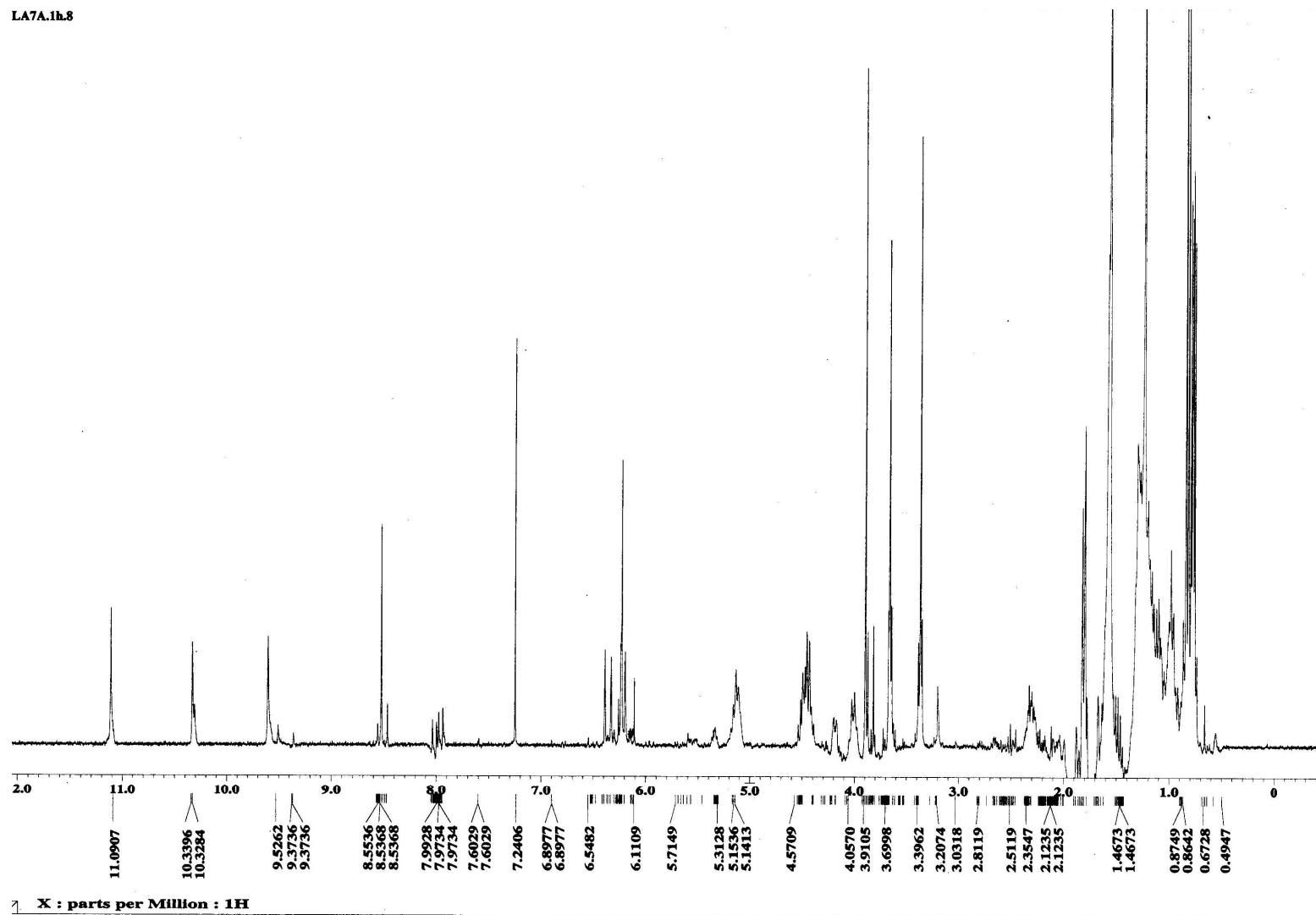


FIGURA 51. ESPECTRO GERAL DE RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA7A (δ E ppm)

LA7A.1h.8

FIGURA 52. ESPECTRO GERAL DE RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) DE LA7A (δ E ppm)

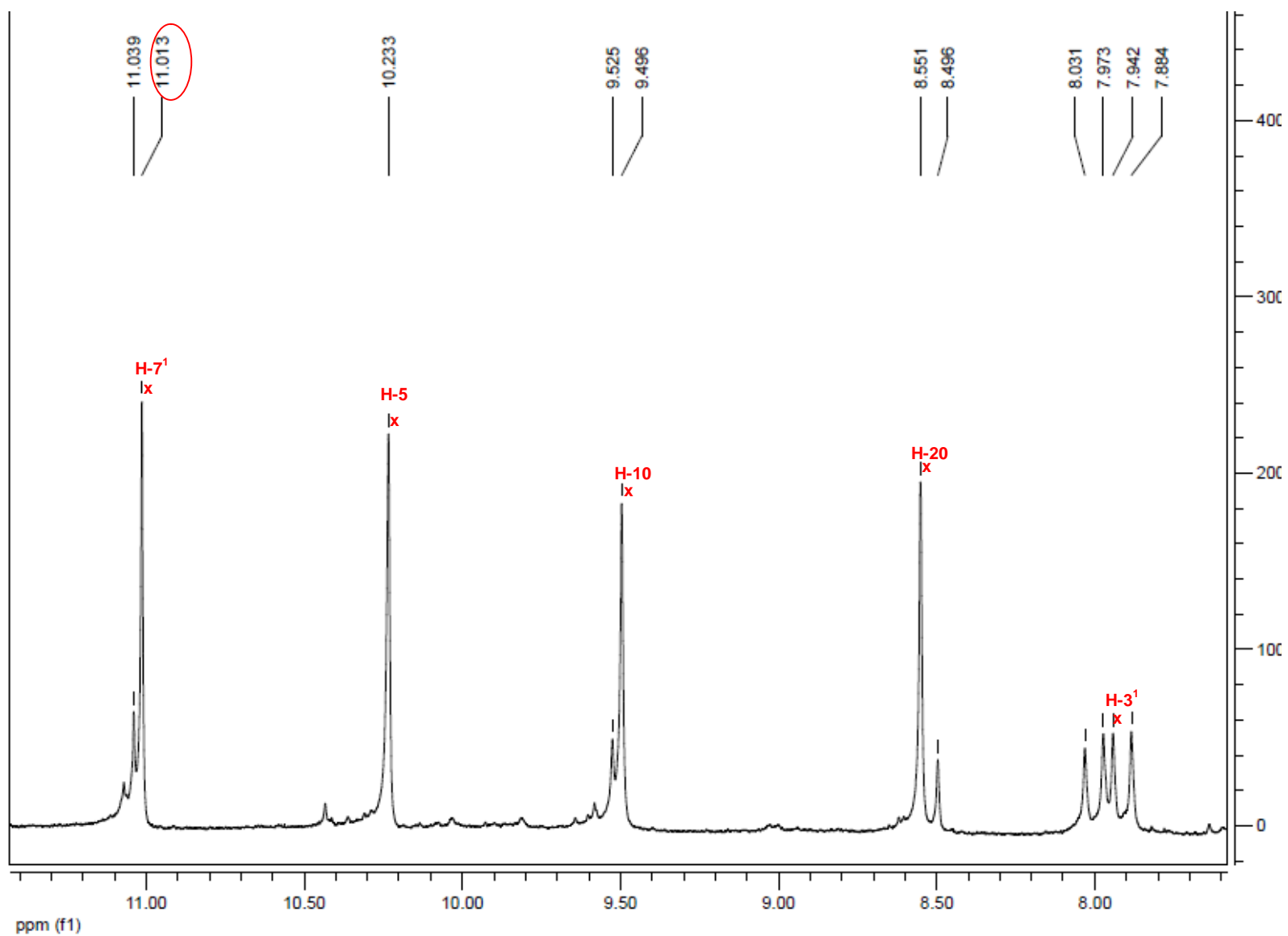


FIGURA 53. EXPANSÃO DA REGIÃO δ 8-11 DO ESPECTRO DE RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) DE LA7A

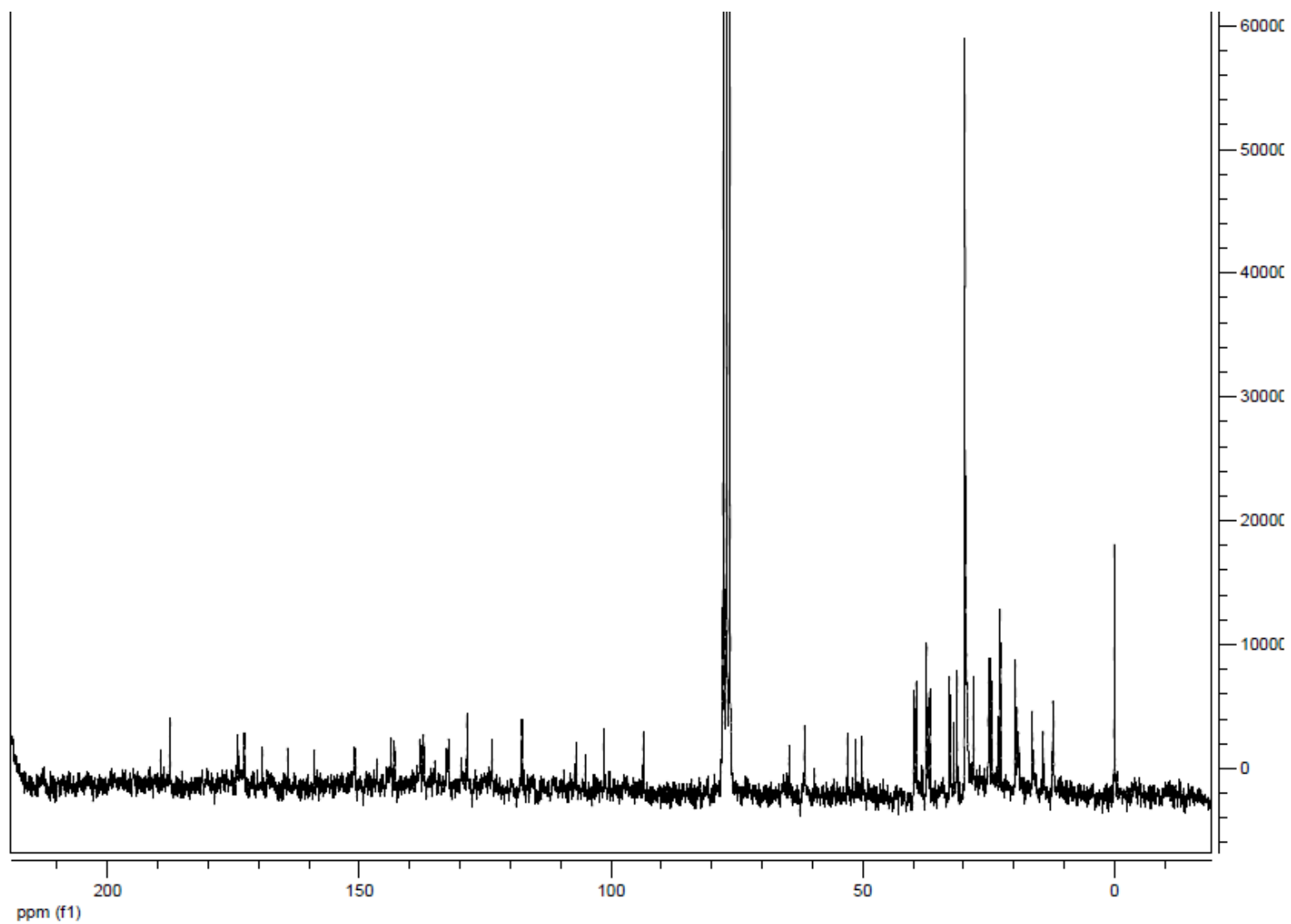


FIGURA 54. ESPECTRO GERAL DE RMN- ^{13}C (52 MHz, CDCl_3) DE LA7A (δ E ppm)

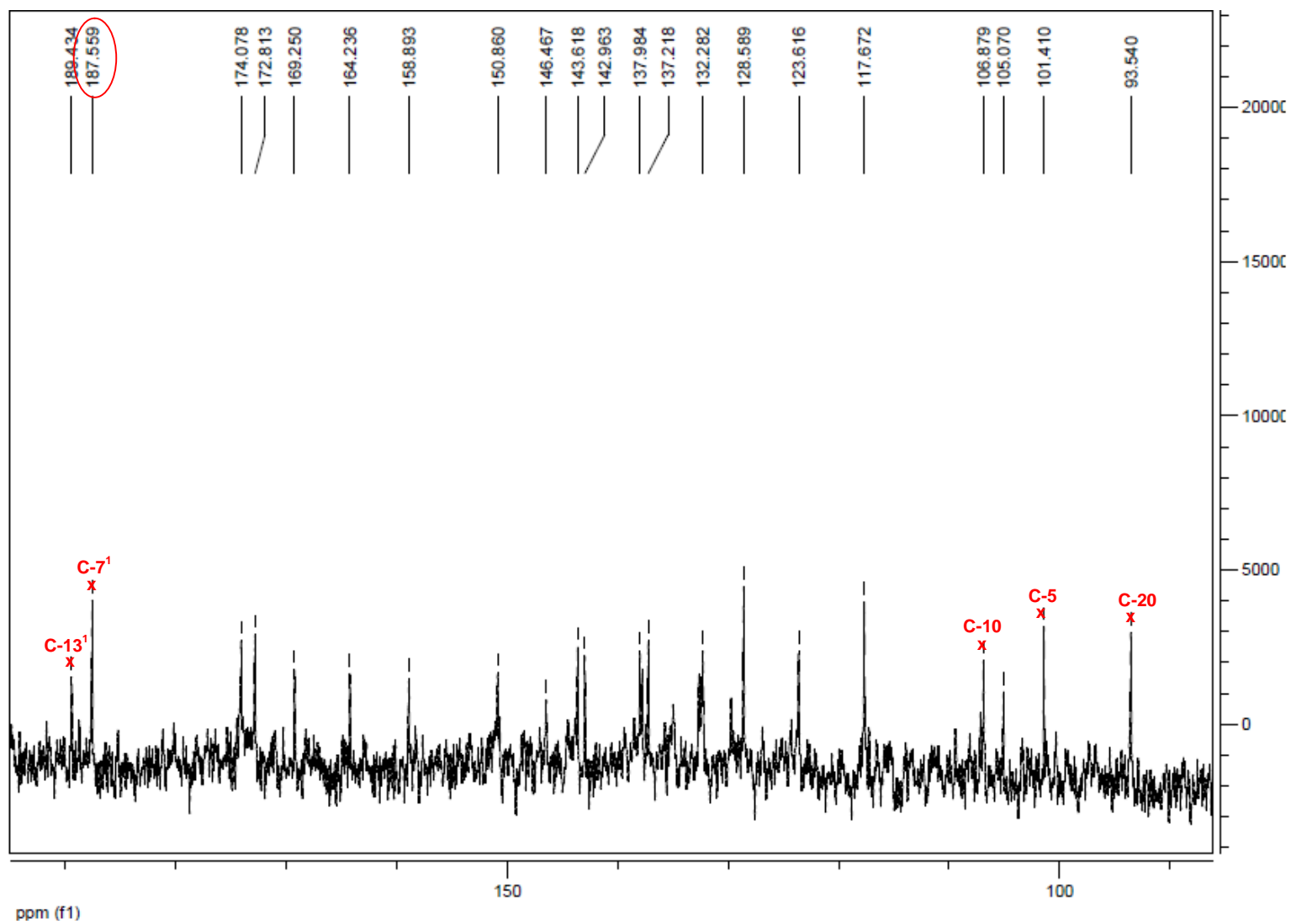


FIGURA 55. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) NA REGIÃO DE δ 90-200 ppm DE LA7A

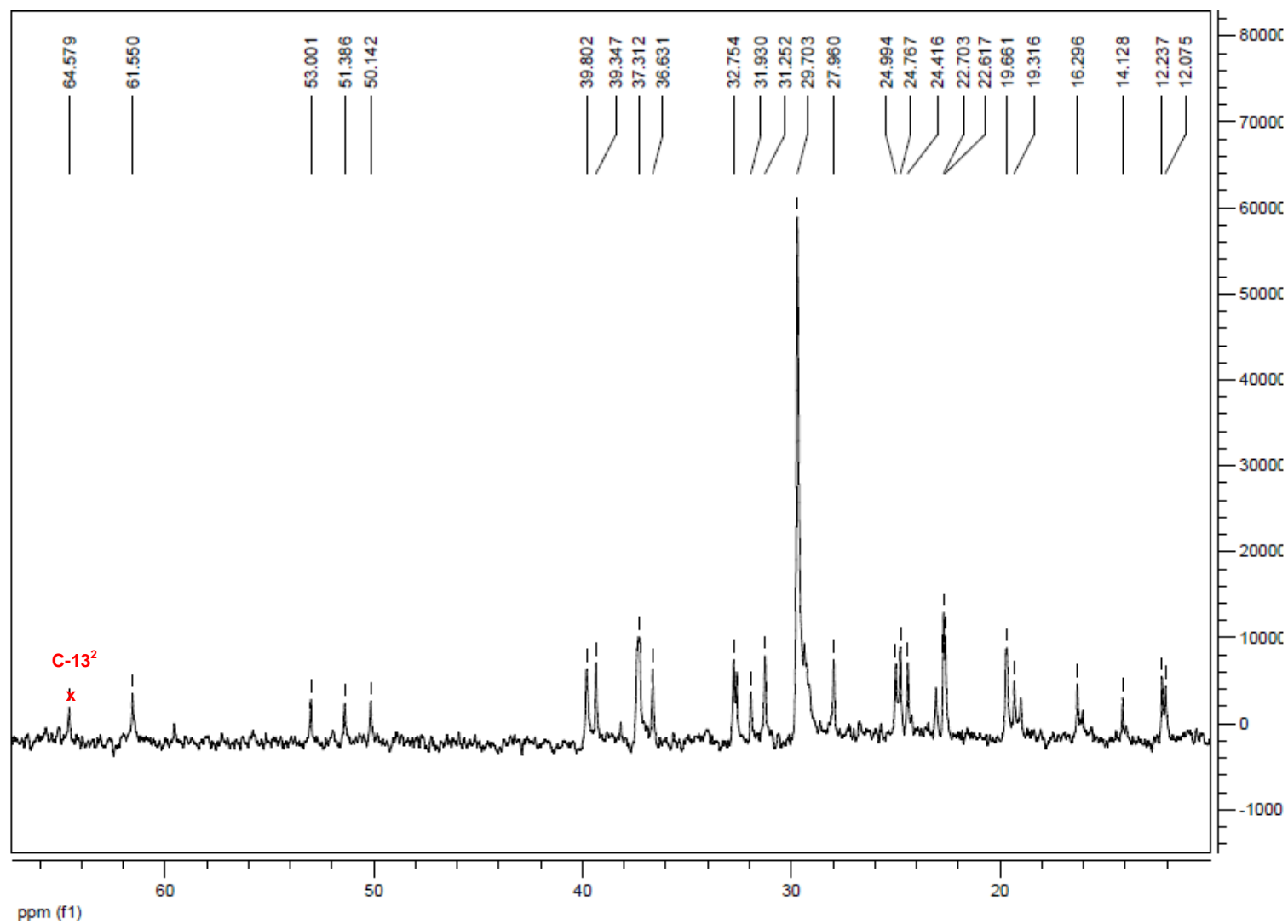


FIGURA 56. EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) NA REGIÃO DE δ 10-70 ppm DE LA7A

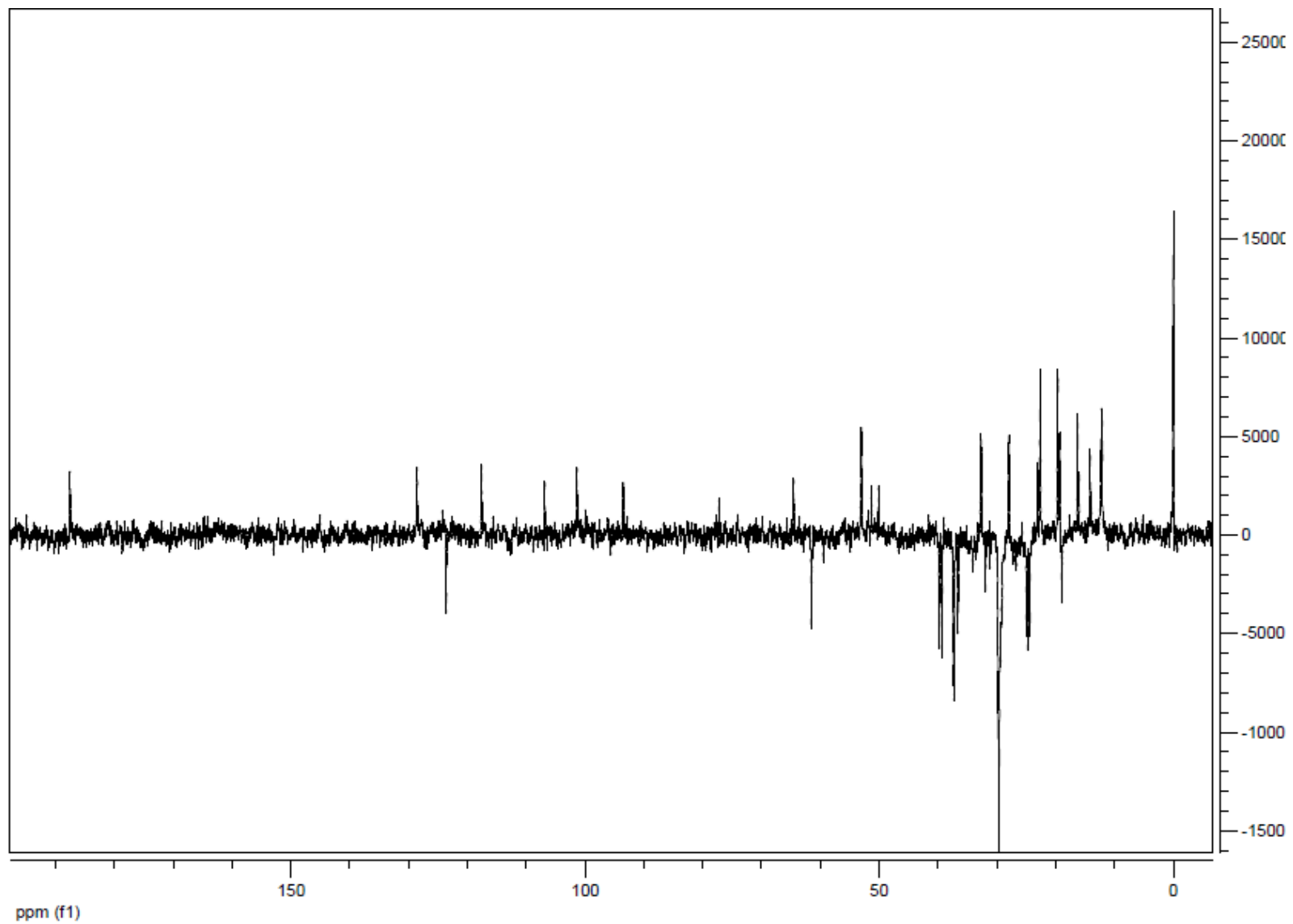


FIGURA 57. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) DE LA7A

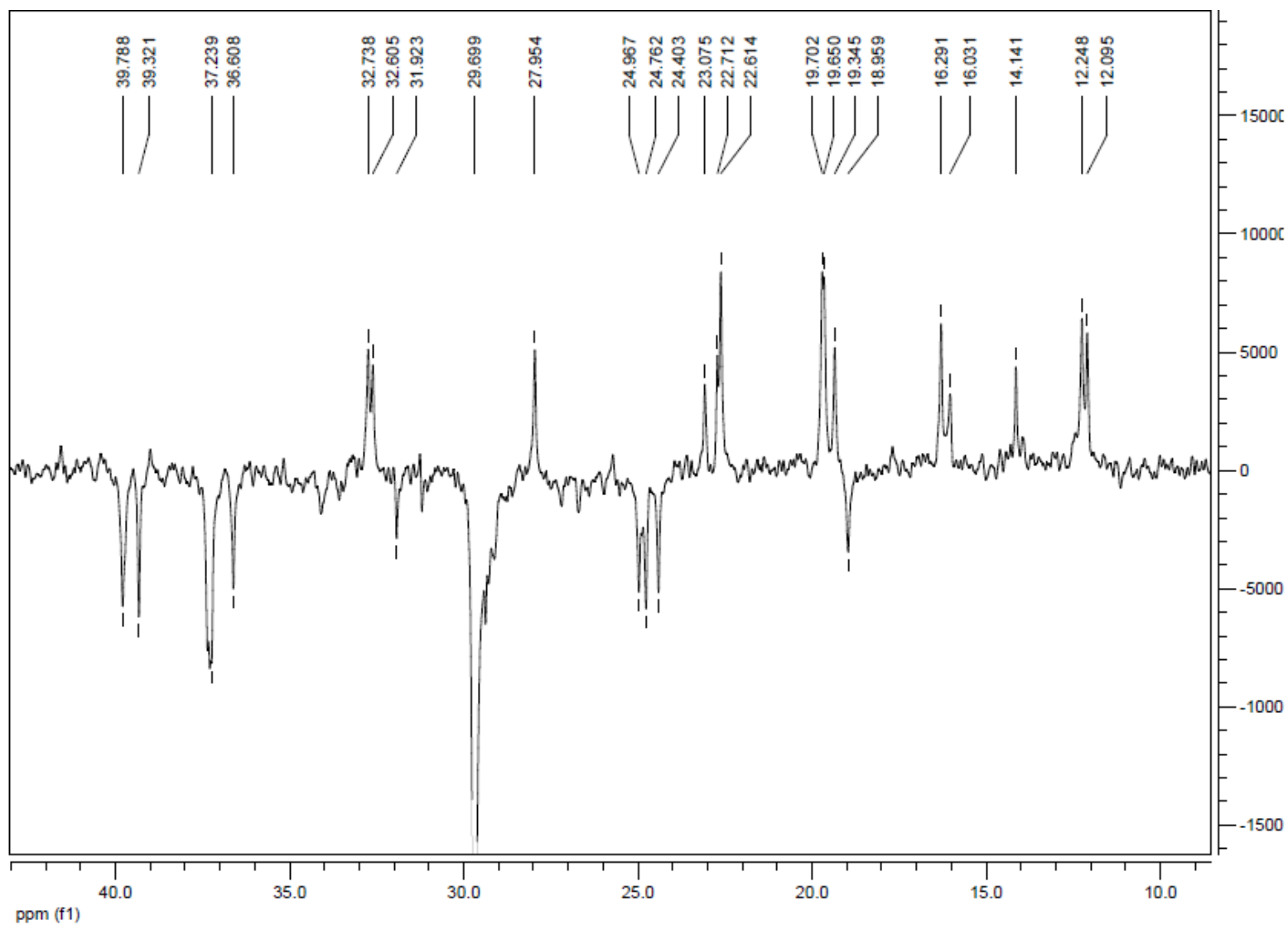


FIGURA 58. EXPANSÃO DE RMN DE ^{13}C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) DE LA7A, REGIÃO DE δ 10-50 ppm

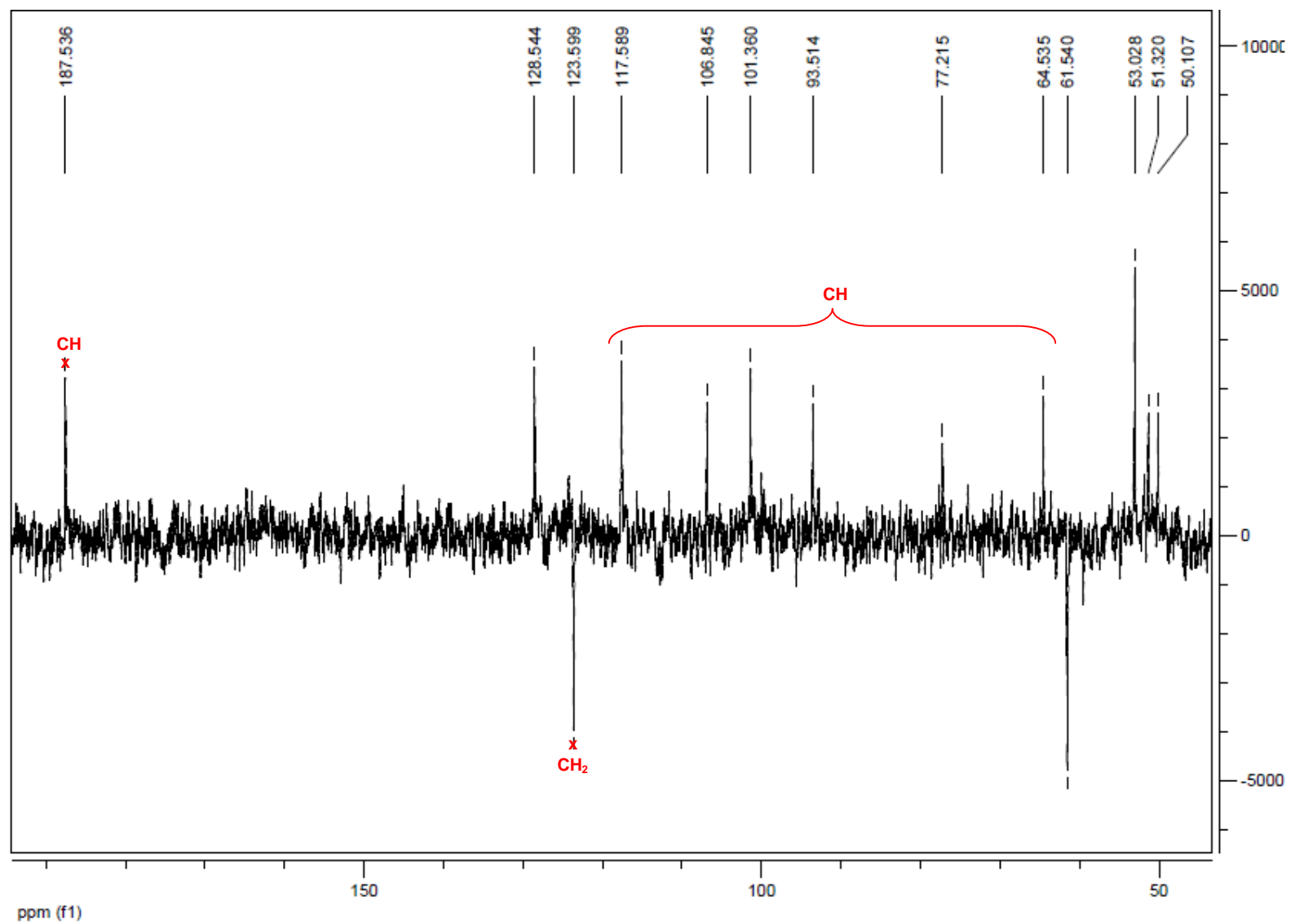


FIGURA 59. EXPANSÃO DE RMN DE ^{13}C DE DEPT 135 (50 MHz, CDCl_3) DE LA7A, REGIÃO DE δ 50-200 ppm

4.2.5 Atividade antioxidante pela redução do radical DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante das amostras testadas (extrato etanólico bruto e frações) de folha e caule, foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e, por regressão linear, foi possível determinar a IC₅₀ (TABELA 7), ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. A vitamina C e a rutina foram utilizadas como padrões (GRÁFICOS 1-5).

TABELA 7. DETERMINAÇÃO DE IC₅₀ E CLASSIFICAÇÃO DE TUKEY PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO DPPH DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

PADRÃO	IC ₅₀ (µg) ± DP	TESTE DE TUKEY
Vitamina C	4,36 ± 0,13	a1
Rutina	6,69 ± 0,30	a1
AMOSTRA		
FOLHA		
Extrato bruto	8,83 ± 0,24	a1
Fração hexânica	212,53 ± 62,68	a4
Fração clorofórmica	13,21 ± 0,11	a1
Fração de acetato de etila	4,86 ± 0,02	a1
Fração hidroalcoólica	9,75 ± 0,2	a1
CAULE		
Extrato bruto	9,22 ± 0,55	a1
Fração hexânica	63,88 ± 0,31	a2
Fração clorofórmica	13,97 ± 0,02	a1
Fração de acetato de etila	65,89 ± 4,34	a2
Fração hidroalcoólica	156,73 ± 5,83	a3

Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente, IC₅₀= concentração inibitória média, DP= desvio-padrão

GRÁFICO 1. CURVA PADRÃO DA VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH

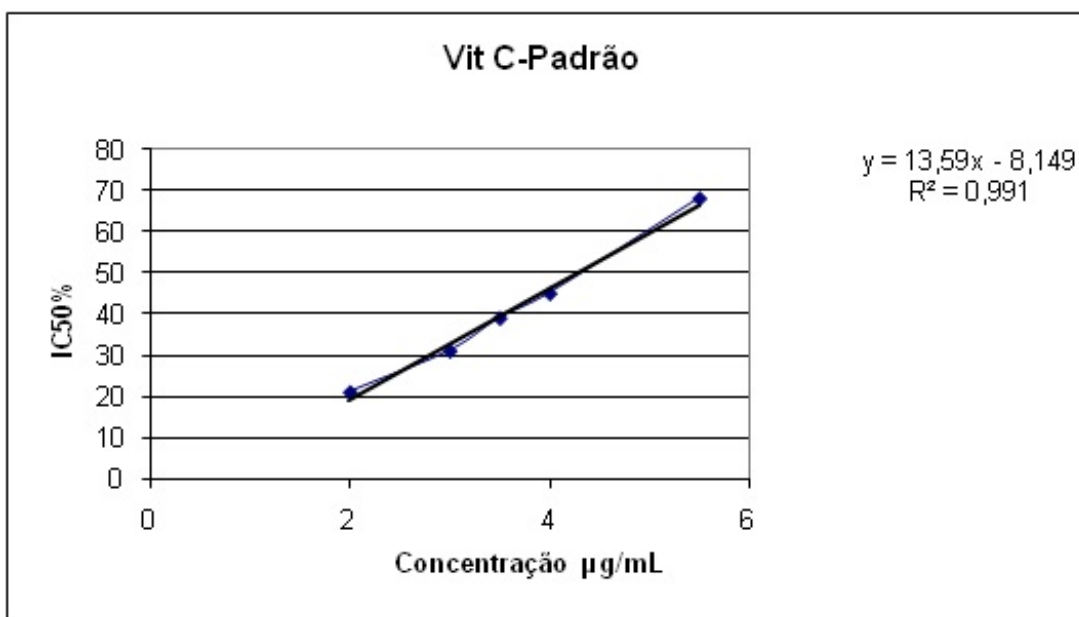


GRÁFICO 2. CURVA PADRÃO DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH

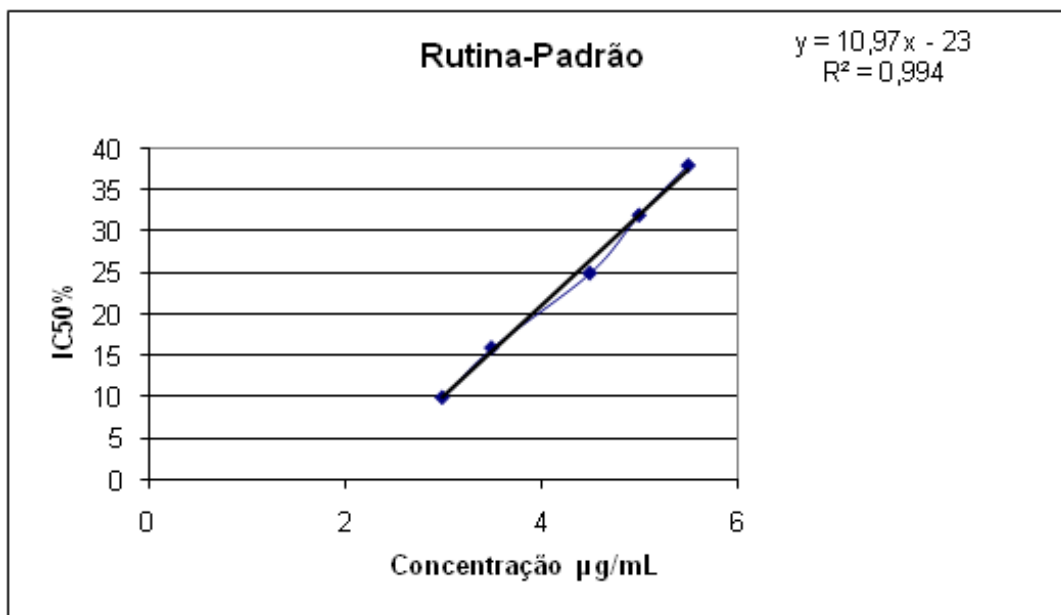


GRÁFICO 3. CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE PELA REDUÇÃO DO DPPH

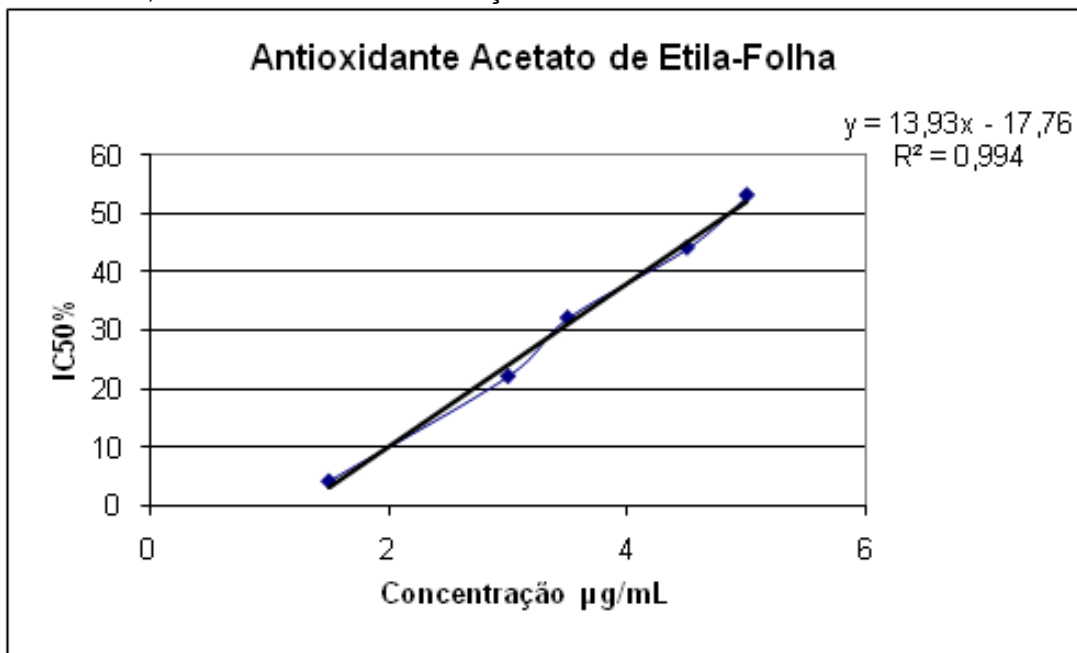
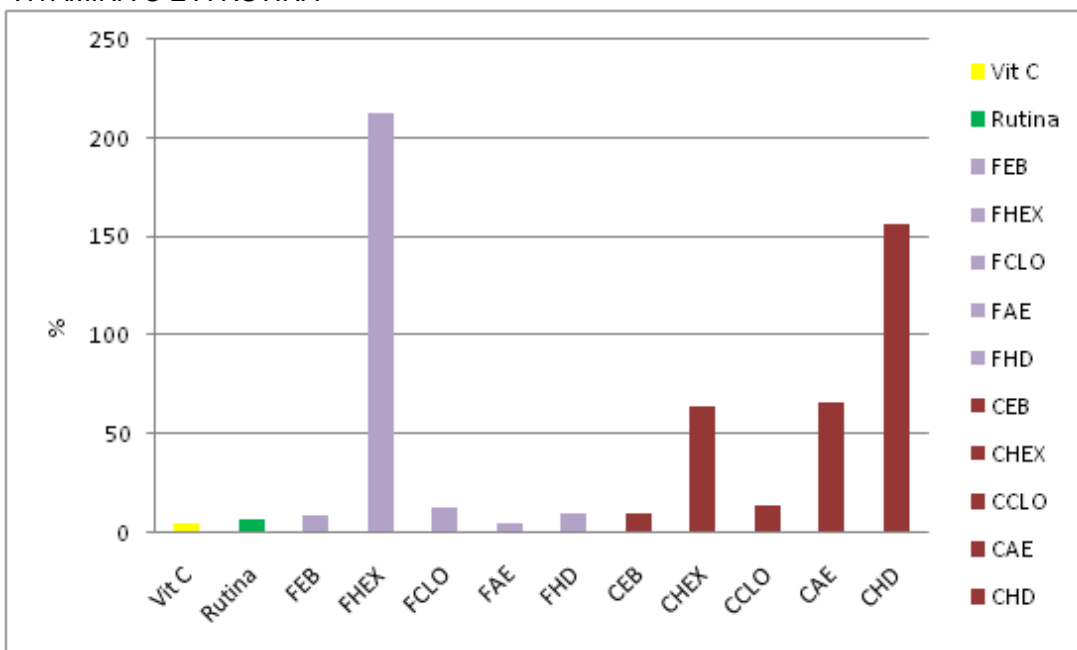


GRÁFICO 4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO DPPH DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E À RUTINA



Observando a análise estatística dos dados (GRÁFICO 4), verificou-se que o extrato etanólico bruto e as frações clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica de folha e o extrato etanólico bruto e a fração clorofórmica de caule têm atividade antioxidante similar aos padrões (vitamina C e rutina), pois não há diferença estatística significativa entre essas amostras. A fração de acetato de etila apresenta valor mais próximo de IC_{50} ($4,86 \pm 0,02$) ao dos padrões, possuindo atividade antioxidante maior com relação às demais amostras. Já a fração hexânica de folha possui um valor bem superior de IC_{50} , do mesmo modo que as frações hexânica, de acetato de etila e hidroalcoólica de caule, indicando que são menos ativas do que os padrões analisados e as demais amostras, pois é preciso uma quantidade maior dessas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

Pesquisas da atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações de folha e caule de *Eugenia brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* utilizando os métodos de DPPH, potencial redutor e potencial inibidor da peroxidação lipídica demonstraram que as duas primeiras espécies tiveram atividade antioxidante em ambos os métodos em relação à última, no extrato bruto e nas frações de folha e caule, porém observou-se maior atividade nas frações de folha (MAGINA *et al.*, 2010). Com relação a flavonoides e compostos fenólicos nas espécies, correlacionando a presença desses compostos com a possível atividade antioxidante das mesmas, foi observado que em *E. beaurepaireana* e *E. brasiliensis* a concentração de flavonoides é maior na fração de acetato de etila de folhas e que o conteúdo de compostos fenólicos é maior no extrato bruto de caule. Porém, fracionando-se o extrato bruto de folha, obteve-se na fração de acetato de etila maior concentração de compostos fenólicos. Na espécie *E. umbelliflora* foram vistos flavonoides em menor quantidade na fração butanólica e no extrato bruto de folha, e também na fração butanólica foi observada maior presença de compostos fenólicos, a qual mostrou uma polaridade maior em relação às das outras espécies.

No teste de atividade antioxidante realizado com o DPPH, a espécie *E. brasiliensis* apresentou maior atividade na fração butanólica de folha e na de acetato de etila de caule. A espécie *E. beaurepaireana* revelou maior atividade na fração de acetato de etila de folha e *E. umbelliflora* teve maior atividade na fração butanólica de folha. Comparando-se com *E. pyriformis*, também testada pelo método de DPPH, esta também apresentou maior atividade antioxidante nas amostras de folha, em especial na fração de acetato de etila, assim como *E. beaurepaireana*. De acordo

com os resultados observados, a atividade antioxidante se concentra em frações de maior polaridade, porém aparece também em frações de polaridades diferentes, o que aconteceu também no estudo feito por Magina *et al.* (2010).

Extratos etanólicos de folha de *E. jambolana* Lam. e *E. uniflora* foram estudados por Santos *et al.* (2010), que avaliaram a atividade antioxidante frente ao DPPH. A espécie *E. jambolana* apresentou alta atividade comparada com *E. uniflora*, devido à presença de compostos fenólicos. Notando-se os resultados obtidos com o extrato etanólico bruto de *E. pyriformis*, pode-se observar que este também possui alta atividade antioxidante.

Folhas de *Eugenia pollicina* J. Guého & A.J. Scott foram testadas para avaliação da capacidade antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), que é um derivado da vitamina E, porém é um composto solúvel em água. Foram testadas frente à capacidade redutora de cloreto férrico, no ensaio de peroxidação lipídica, em doseamento de cobre-fenantrolina e na avaliação da atividade antioxidante em emulsões óleo-água. Os melhores resultados foram obtidos no TEAC e na capacidade redutora de cloreto férrico. No terceiro teste de cobre-fenantrolina a atividade foi baixa e nos demais também apresentou atividade antioxidante, podendo ser considerada uma espécie com atividade antioxidante importante (RAMFUL *et al.*, 2010).

Frutos de sete espécies foram avaliados com relação à atividade antioxidante pelo DPPH, acerola (*Malpighia emarginata* DC.), açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), caju (*Anacardium occidentale* L.), murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth), uvaia (*E. pyriformis*), mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). Os frutos de *E. pyriformis* mostraram atividade antioxidante baixa comparada com a vitamina C e às outras plantas estudadas (RUFINO *et al.*, 2009). Em outro estudo realizado com o óleo essencial dos frutos de *E. pyriformis*, a atividade antioxidante observada foi insignificante (STIEVEN *et al.*, 2009).

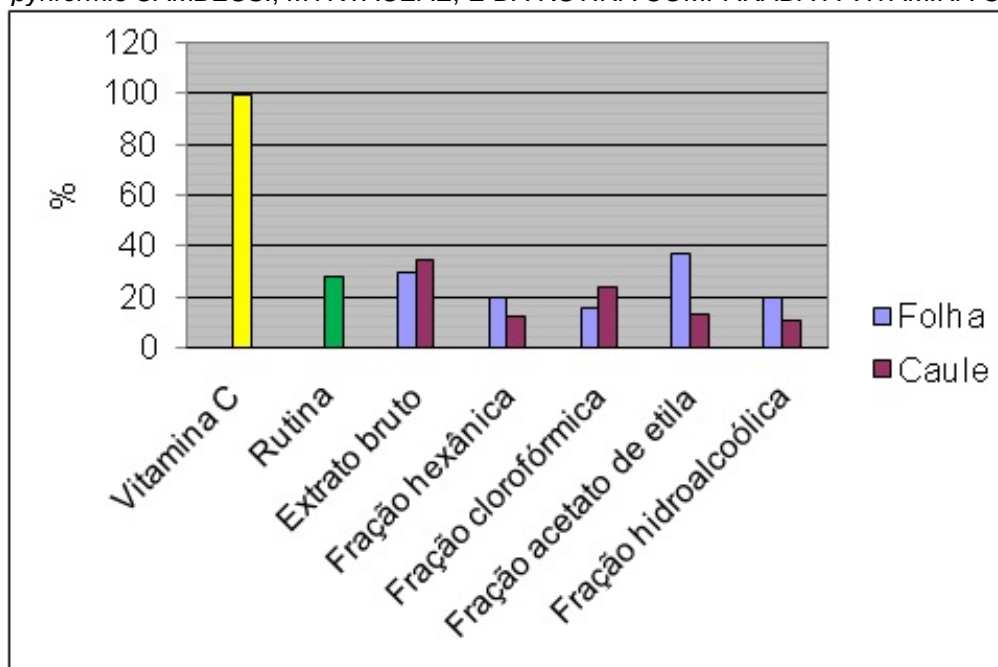
4.2.6 Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio

A atividade antioxidante de cada amostra (extrato etanólico bruto e frações hexânica, clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica) e da rutina foi calculada em relação à vitamina C, cuja atividade foi considerada 100%. Os resultados encontrados são mostrados na TABELA 8 e no GRÁFICO 5.

TABELA 8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E À RUTINA

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C (%)	
Rutina	28,25	
	FOLHA	CAULE
Extrato bruto	29,31	34,15
Fração hexânica	19,58	12,08
Fração clorofórmica	16,00	24,00
Fração de acetato de etila	37,05	13,25
Fração hidroalcoólica	19,93	11,06

GRÁFICO 5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, E DA RUTINA COMPARADA À VITAMINA C



Das frações testadas, pode-se concluir que todas apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio. Considerando as atividades da rutina e da vitamina C como referências, as frações analisadas não

mostraram diferenças significativas (GRÁFICO 5), concluindo-se que as amostras são menos ativas, com exceção do extrato etanólico bruto de folha e caule, e da fração de acetato de etila de folha, que têm atividade um pouco superior à da rutina.

Observando-se os resultados positivos em ambos os testes, pode-se considerar que *E. pyrifomis* demonstrou atividade relevante nas amostras de folha e caule, sendo considerada eficiente sequestradora de radicais livres, podendo ser benéfica na prevenção e formação dos mesmos. Posteriormente poderão ser feitos novos testes, os quais não foram realizados neste trabalho e foram citados nesta discussão, para acrescentar dados à espécie e também realizá-los *in vivo* para confirmação dos dados.

4.3 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) das amostras testadas (extrato etanólico bruto e frações) de folha e caule foi realizada de acordo com a presença de coloração vermelha. De acordo com Holetz *et al.* (2002), resultados acima de 1000 µg/mL para extratos vegetais indicam que não há inibição do crescimento bacteriano, enquanto que resultados entre 1000-500 µg/mL indicam atividade fraca. Resultados entre 100-500 µg/mL revelam atividade moderada e abaixo de 100µg/mL considera-se uma boa atividade antibacteriana.

Neste teste, foi avaliada também a atividade antimicrobiana do extrato acetônico bruto e de dois compostos isolados: LA4D e LA6A. Os resultados podem ser observados nas TABELAS 9 e 10.

TABELA 9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Enterococcus faecalis*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
FOLHA				
Extrato etanólico bruto	78	625	1250	2500
Fração hexânica	>200	>200	>200	>200
Fração clorofórmica	>200	>200	>200	>200
Fração de acetato de etila	50	>200	>200	100
Fração hidroalcoólica	100	>200	>200	200
CAULE				
Extrato etanólico bruto	156	625	2500	312
Fração hexânica	>200	>200	>200	>200
Fração clorofórmica	>200	>200	>200	>200
Fração de acetato de etila	>200	>200	>200	>200
Fração hidroalcoólica	>200	>200	>200	>200

TABELA 10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ACETÔNICO BRUTO E DOS COMPOSTOS ISOLADOS LA4D E LA6A, OBTIDOS DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Enterococcus faecalis*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
FOLHA				
Extrato acetônico bruto	50	>200	>200	100
LA4D	>200	>200	>200	>200
LA6A	>200	>200	>200	>200
CAULE				
Extrato acetônico bruto	50	>200	200	100

Foi comprovado em estudos anteriores que a técnica de microdiluição, com microplacas de Elisa, possui 30 vezes mais sensibilidade, podendo ser utilizadas pequenas quantidades de amostra e com maior reprodutibilidade (ELOFF, 1998).

Analisando os resultados, pode-se observar que o extrato etanólico bruto de folha apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, possuindo boa atividade inibitória contra o primeiro e fraca contra o segundo, entretanto não possuindo atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. As frações de acetato de etila e hidroalcoólica de folha apresentam boa atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *S. aureus* e *E. faecalis*. Na fração de acetato de etila de folha foi observada uma maior inibição contra *S. aureus*. O extrato etanólico bruto de caule apresenta inibição contra *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis* e não apresenta atividade contra *P. aeruginosa*. As frações do caule não apresentam atividade inibitória maior.

Com relação ao extrato acetônico bruto de folha, foi verificada atividade contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, sendo que os compostos isolados LA4D e LA6A não apresentam atividade inibitória. O extrato acetônico de caule também mostra atividade inibitória para os mesmos microrganismos que o extrato acetônico bruto de folha.

Três espécies de *Eugenia* foram estudadas por Benfatti *et al.* (2010), avaliando sua atividade sobre micoplasma, que são microrganismos causadores de uretrites e doenças sexualmente transmissíveis. Foi verificado que todos os extratos etanólicos das espécies *E. beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand, *E. brasiliensis* Lam. e *E. umbelliflora* O. Berg possuem atividade antimicrobiana, mesmo em pequenas concentrações, contra as cepas *Mycoplasma hominis*, *M. arginini* e *Ureaplasma urealyticum*.

Folhas de *E. uniflora* foram testadas quanto à atividade antimicrobiana, apresentando resultados satisfatórios frente aos microrganismos *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, com maiores níveis de atividade antimicrobiana frente às duas primeiras bactérias (AURICCHIO *et al.*, 2007).

Avaliação antibacteriana foi realizada em extrato etanólico de folha de *Eugenia obtusifolia* Cambess., sendo que este apresentou atividade relevante contra *E. coli* (BUSSMANN *et al.*, 2010). Comparando-se com o presente estudo, em *E. pyriformis* também foi observada atividade contra *E. coli*.

Estudo realizado com extrato etanólico bruto e frações de folha de *E. uniflora* (FIUZA *et al.*, 2009) frente a cepas de *P. aeruginosa* demonstrou sua maior atividade de inibição, sendo que todas as cepas foram inibidas pelo extrato etanólico bruto e pela fração de acetato de etila. A fração clorofórmica demonstrou uma atividade menor e a hexânica não revelou efeito. Em discordância, *E. pyriformis* não apresentou atividade inibitória contra essa cepa nesta investigação, mostrando resultados irrelevantes.

Em estudo realizado por Stieven *et al.* (2009), avaliando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de fruto de *E. pyriformis*, este demonstrou ser ativo contra as bactérias patogênicas *E. faecalis*, *E. coli* e *S. aureus*, incentivando o uso em produtos alimentícios ao aumentar seu tempo de prateleira.

Devido à grande resistência aos antibióticos existentes, a busca por novos compostos de origem vegetal está aumentando. O Brasil, sendo um país com rica diversidade de ecossistemas e com inúmeras plantas de uso popular, é alvo de muitos desses estudos. Isso demonstra a necessidade da descoberta de princípios ativos de plantas, guiados pela medicina popular, mas que devem ter seus efeitos cientificamente comprovados, para garantir um uso seguro e eficaz. Desses estudos podem ser descobertos compostos promissores com potencial atividade antimicrobiana (OSTROSKY *et al.*, 2008 ; SANTOS *et al.*, 2010).

4.3.2 Avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*

Foram submetidos ao teste o extrato etanólico bruto e as frações hexânica, clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule. De acordo com a TABELA 11, o extrato etanólico bruto e as frações hexânica e hidroalcoólica de folha e o extrato etanólico bruto e a fração clorofórmica de caule não obtiveram resultados significativos, enquanto que os demais obtiveram bons resultados.

TABELA 11. MORTALIDADE E ÍNDICE DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* AVALIADOS FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E ÀS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA E CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE

AMOSTRA	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO (µg/mL)				DL ₅₀ (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
	10	100	500	1000		
FOLHA/FRAÇÃO						
Clorofórmica	1	2	9	10	201,36	(154,54-262,37)
Acetato de etila	0	0	8	10	292,52	(244,87-349,44)
CAULE/FRAÇÃO						
Hexânica	2	0	10	10	217,04	(196,80-240,25)
Acetato de etila	0	2	10	10	115,21	(113,64-201,22)
Hidroalcoólica	0	2	10	10	115,21	(113,64-201,22)
CONTROLE						
Quinidina	10	10	-	08	50,12	(35,80-70,16)

O teste realizado com *Artemia salina*, que é um microcrustáceo de água salgada, é considerado acessível, pois seus ovos são encontrados a baixo custo em lojas especializadas em aquários e se utilizam pequenas quantidades de amostras (por ex., microgramas). Os ovos servem de alimento para peixes, sobrevivem a estresses e, se conservados em lugar seco, podem ter vida longa de uso. O ensaio de toxicidade com esses microcrustáceos vem sendo aplicado na avaliação de extratos vegetais, metais pesados, resíduos de pesticidas e toxinas fúngicas (KRISHNARAJU, 2005). A toxicidade é estimada através da dose letal média (DL₅₀) (MEYER *et al.*, 1982). Quando o extrato apresenta DL₅₀ < 250 µg/mL, é indicativo de alta atividade tóxica sobre o microcrustáceo (COSTA *et al.*, 2009).

As atividades antifúngica, antiviral, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida vêm sendo relacionadas com a toxicidade frente a *Artemia salina*, devido ao possível efeito dos extratos vegetais (MEYER *et al.*, 1982).

Analisando os resultados, é possível observar que algumas amostras, como as frações clorofórmica e de acetato de etila de folha e as frações hexânica, de acetato de etila e hidroalcoólica de caule apresentam atividade frente a *Artemia salina*, com resultados de DL₅₀ inferiores a 1000 µg/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982). Os controles utilizados (solvente etanol e solvente salina) não apresentam influência sobre os

resultados, uma vez que não houve mortalidade das larvas avaliadas. Desse modo, as frações citadas anteriormente possuem toxicidade frente ao microcrustáceo.

Em pesquisas realizadas com a espécie da família Myrtaceae *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, foi observada atividade citotóxica frente ao microcrustáceo no extrato bruto de folha e na fração clorofórmica (DOMINGUES *et al.*, 2010). Comparando-se com *E. pyriformis*, esta apresentou atividade nas frações de folha (clorofórmica e de acetato de etila), não demonstrando atividade no extrato bruto.

Pesquisas realizadas com o extrato etanólico de folha de *E. uniflora* para avaliar a atividade citotóxica frente a *Artemia salina* apresentaram $DL_{50} > 1000\mu\text{g/mL}$, sendo o extrato pouco ativo e com atividade de valor insignificante (MONTANHER *et al.*, 2002), ao contrário das frações de folha (clorofórmica e de acetato de etila) avaliadas em *E. pyriformis*, em que foram observados efeitos citotóxicos.

4.3.3 Avaliação da atividade alelopática

Para o ensaio da atividade alelopática, foram testados o extrato etanólico bruto e as frações hexânica, clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule. Os resultados para avaliação da germinação constam das TABELAS 12 e 13.

TABELA 12. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLORFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)				CONTROLE	
	0,8	0,4	0,2	0,1	ÁGUA	ETANOL
EB	5,00 a1	4,88 a1	4,12 a1	4,75 a1	4,88 a1	4,75 a1
FH	5,00 a1	4,75 a1	4,88 a1	4,25 a1	4,88 a1	4,75 a1
FCLO	5,00 a1	4,75 a1	4,88 a1	5,00 a1	4,88 a1	4,75 a1
FAE	5,00 a1	4,00 a1	5,00 a1	4,62 a1	4,88 a1	4,75 a1
FHD	4,75 a1	4,62 a1	4,88 a1	5,00 a1	4,88 a1	4,75 a1

EB= Extrato etanólico bruto; FH= Fração hexânica; FCLO= Fração clorofórmica; FAE= Fração de acetato de etila; FHD= Fração hidroalcoólica

*Nota: médias que têm a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente

TABELA 13. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)				CONTROLE	
	0,8	0,4	0,2	0,1	ÁGUA	ETANOL
EB	4,62 a1	4,50 a1	4,88 a1	4,38 a1	4,88 a1	4,75 a1
FH	4,62 a1	4,50 a1	4,38 a1	4,50 a1	4,50 a1	4,50 a1
FCLO	4,75 a1	4,38 a1	4,50 a1	4,62 a1	4,50 a1	4,50 a1
FAE	4,75 a1	4,88 a1	4,88 a1	4,88 a1	4,50 a1	4,50 a1
FHD	4,45 a1	4,25 a1	4,38 a1	4,45 a1	4,88 a1	4,75 a1

EB= Extrato etanólico bruto; FH= Fração hexânica; FCLO= Fração clorofórmica; FAE= Fração de acetato de etila; FHD= Fração hidroalcoólica

*Nota: médias que têm a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente

Analisando os dados estatísticos, concluiu-se que nenhuma das amostras apresenta influência sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa*, pois pertencem ao mesmo grupo de classificação (a1), sendo iguais aos controles água e etanol.

Nas TABELAS 14 e 15, podem-se observar os resultados referentes à interferência das amostras no crescimento das sementes de *L. sativa*.

TABELA 14. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE FOLHA DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*

CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	REPETIÇÃO	RADÍCULA (média em mm)					HIPOCÓTILO (média em mm)				
		EB	FH	FCLO	FAE	FHD	EB	FH	FCLO	FAE	FHD
0,8	1	32,60	33,20	39,00	18,40	28,60	28,40	26,20	38,40	27,20	35,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	31,80	29,80	33,20	27,60	28,40	31,60	36,20	37,40	33,80	32,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	24,80	19,80	34,40	25,00	26,80	30,40	22,40	40,00	31,60	38,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	37,40	25,60	35,60	25,60	23,80	31,60	31,60	42,40	36,60	29,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
0,4	1	31,40	18,40	32,20	31,20	29,60	30,80	26,20	39,80	28,20	31,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	32,20	36,00	34,60	37,80	25,60	34,40	31,40	36,60	32,20	30,40
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	24,20	21,60	38,00	26,80	29,40	21,00	25,20	43,60	32,00	27,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	33,60	33,00	37,00	27,60	29,40	32,60	25,60	45,60	25,80	35,40
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
0,2	1	26,60	24,80	38,00	32,60	38,80	25,40	29,60	40,20	34,40	32,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	28,20	29,80	30,60	33,80	21,60	35,20	35,20	40,00	38,00	31,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	21,60	23,80	31,40	21,00	27,80	23,20	27,00	41,60	27,60	36,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	29,60	36,40	33,00	33,40	32,00	33,00	40,20	40,20	37,00	41,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
0,1	1	28,40	27,00	31,20	34,20	29,40	31,20	38,00	41,80	37,60	29,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	29,20	28,00	30,20	28,00	20,00	29,20	36,20	38,80	32,60	26,40
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	31,00	17,60	33,40	36,00	27,00	31,60	26,00	40,40	33,20	32,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	26,80	29,00	33,00	35,40	30,00	29,60	33,80	42,00	35,40	37,00
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
CONTROLE											
ÁGUA	1	37,40	31,80	32,80	37,40	32,80	37,40	31,80	32,80	37,40	32,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	25,20	31,00	26,20	25,20	26,40	25,20	31,00	26,20	25,20	26,40
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	32,80	30,00	29,60	32,80	30,60	32,80	30,00	29,60	32,80	30,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	22,80	18,40	24,80	22,80	28,80	22,80	18,40	24,80	22,80	28,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
ETANOL	1	24,00	25,40	33,20	24,00	33,20	24,00	25,40	33,20	24,00	33,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	29,80	27,40	30,80	29,80	30,80	29,80	27,40	30,80	29,80	30,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	34,20	31,00	33,40	34,20	33,40	34,20	31,00	33,40	34,20	33,40
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	28,60	28,60	19,80	28,60	19,80	28,60	28,60	19,80	28,60	19,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1

EB= Extrato etanólico bruto; FH= Fração hexânica; FCLO= Fração clorofórmica; FAE= Fração de acetato de etila; FHD= Fração hidroalcoólica

*Nota: médias que têm a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente

TABELA 15. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXÂNICA, CLOROFÓRMICA, DE ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, PROVENIENTES DE CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT PARA O CRESCIMENTO DA RADÍCULA E DO HIPOCÓTILO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*

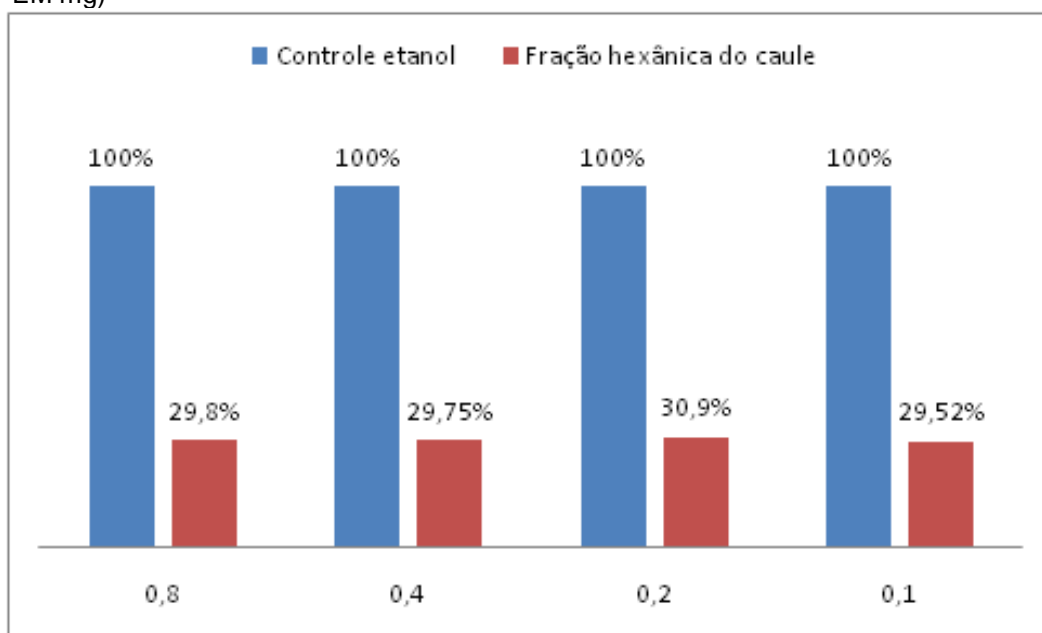
CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	REPETIÇÃO	RADÍCULA (média em mm)					HIPOCÓTILO (média em mm)				
		EB	FH	FCLO	FAE	FHD	EB	FH	FCLO	FAE	FHD
0,8	1	32,20	31,20	39,00	35,00	32,60	37,80	27,60	29,80	32,40	27,80
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	31,00	31,60	33,40	29,60	26,80	40,20	24,20	29,80	31,00	32,20
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	32,60	30,00	35,40	31,40	31,40	24,40	25,40	32,60	32,80	28,60
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	31,00	26,40	36,20	31,60	33,20	38,00	26,60	30,80	29,60	33,80
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
0,4	1	31,00	29,00	36,60	36,20	31,40	34,20	31,20	35,20	34,60	38,20
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	33,20	30,00	36,60	23,00	31,60	33,80	28,80	29,40	27,80	33,20
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	31,80	29,40	37,40	28,20	30,60	43,80	31,80	33,20	37,40	41,40
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	34,40	29,20	37,00	26,00	32,40	39,00	24,40	34,20	34,60	46,20
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
0,2	1	39,20	30,40	38,40	32,60	34,40	26,80	29,40	37,20	36,40	35,60
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	28,75	31,40	34,00	36,00	33,00	29,00	28,80	36,40	40,40	37,60
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	30,40	24,00	30,40	27,20	34,40	24,80	24,80	35,60	36,60	42,60
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	30,40	30,00	26,60	22,40	30,00	42,60	31,20	31,80	35,60	24,60
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
0,1	1	30,40	29,00	33,40	35,00	33,20	30,60	22,40	34,00	35,80	34,00
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	36,40	30,00	32,40	40,60	28,00	32,20	25,40	32,80	32,80	38,60
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	27,40	29,40	35,40	29,20	26,00	36,20	30,40	35,60	33,60	36,80
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	30,80	29,20	34,00	31,40	30,00	38,80	29,60	31,80	33,20	42,00
		a1	a2	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
CONTROLE											
ÁGUA	1	32,40	33,80	33,80	39,20	32,40	32,40	33,80	33,80	39,20	32,40
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	33,00	36,80	37,40	32,80	33,00	33,00	36,80	37,40	32,80	33,00
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	30,60	36,40	36,40	38,20	30,60	30,60	36,40	36,40	38,20	30,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	28,80	33,00	33,00	41,60	28,80	28,80	33,00	33,00	41,60	28,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
ETANOL	1	27,20	36,40	39,20	33,80	27,20	27,20	36,40	39,20	33,80	27,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	2	26,80	34,00	35,20	36,00	26,80	26,80	34,00	35,20	36,00	26,80
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	3	29,60	38,20	37,60	36,40	29,60	29,60	38,20	37,60	36,40	29,60
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1
	4	27,20	41,60	41,60	33,00	27,20	27,20	41,60	41,60	33,00	27,20
		a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1	a1

EB= Extrato etanólico bruto; FH= Fração hexânica; FCLO= Fração clorofórmica; FAE= Fração de acetato de etila; FHD= Fração hidroalcoólica

*Nota: médias que têm a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente

A porcentagem de inibição do crescimento da fração hexânica de caule pode ser observada no GRÁFICO 6.

GRÁFICO 6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DE CAULE DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE, PELO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* (PORCENTAGEM DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO CONTROLE ETANOL X DOSES DA AMOSTRA EM mg)



O termo alelopatia (*allelon*= de um para outro, *pathós*= sofrer) foi descrito por Molisch, em 1937, e pode ser interpretado de acordo com Rice (1984): “qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

Substâncias originadas a partir dos metabólitos secundários das plantas, denominadas de aleloquímicos, estão sendo estudadas como meios alternativos em substituição aos herbicidas atuais. Estes atuam ligando-se às membranas da planta receptora ou penetrando nas células, assim interferindo diretamente no seu metabolismo (WALLER, 1999; FERREIRA; AQUILA, 2000).

Devido às substâncias químicas liberadas no meio, a vegetação de uma certa área pode ter um modelo condicionado às plantas pré-existentes e às substâncias químicas que estas liberam. Espécies utilizadas nos testes como *Lactuca sativa* L. (alface) e *Lycopersicum esculentum* Mill. (tomate) são bastante utilizadas nos ensaios de crescimento e germinação devido à sensibilidade das sementes (FERREIRA; AQUILA, 2000).

O fenômeno de germinação é mais simples e menos sensível que o do crescimento, devendo-se observar se a semente germinou ou não e também se

houve alguma anormalidade, como por exemplo, a necrose da semente. O crescimento da planta é avaliado pelo desenvolvimento do hipocótilo e da radícula, que representam parâmetros para avaliar a atividade alelopática (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Não houve diferenças significativas entre o extrato etanólico bruto e as respectivas frações de folha. Entretanto, a fração hexânica de caule causou inibição da radícula em todas as concentrações ensaiadas, sendo que a concentração de 0,2 mg foi a que mais afetou o crescimento da radícula, causando redução de 30,9%. O efeito da fração não ocorreu em função das concentrações, pois não teve um efeito dose-dependente (GRÁFICO 6).

Concentrações mais altas normalmente causam mais efeitos dos aleloquímicos na inibição do crescimento, mas alguns autores afirmam que os efeitos alelopáticos podem escapar desse padrão, resultando de um somatório de alterações moleculares, o que pode ser comprovado pelo resultado, que na concentração de 0,2 mg teve uma maior inibição do crescimento (MARASCHIN-SILVA; AQUILA, 2006).

Os resultados das amostras não diferem estatisticamente dos controles, indicando que não apresentam atividade sobre o crescimento nem do hipocótilo nem da radícula das sementes de *L. sativa*, não demonstrando nenhum efeito tóxico.

Em teste alelopático realizado com o extrato aquoso de folha de *E. dysenterica* sobre sementes de *L. sativa*, Giotto *et al.* (2007) não observaram nenhuma ação com relação à germinação, porém no crescimento foram demonstrados efeitos alelopáticos. Com referência à investigação de Sausen *et al.* (2009), o extrato aquoso de folha de *E. involucrata* DC. apresentou efeitos de diminuição da germinação e do crescimento de *L. sativa*, significando que a espécie poderia dificultar o estabelecimento de novas espécies no meio e em consequência facilitar o estabelecimento inicial desta espécie perante as outras.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Eugenia pyriformis Cambess., Myrtaceae, apresenta características morfológicas e anatômicas concordantes com a família e com o gênero. As descrições de folha e caule apresentadas neste trabalho, juntamente com as ilustrações, podem contribuir para a identificação dessa planta medicinal e subsidiar o controle de qualidade farmacognóstico de uma potencial droga vegetal.

Foi possível constatar semelhanças quanto à morfologia externa em estudos anteriores atribuídos à espécie. Quanto à anatomia, folha com tricomas tectores unicelulares, estômatos anomocíticos na face abaxial, cavidades secretoras, células contendo compostos fenólicos, prismas e drusas de oxalato de cálcio e um único feixe vascular bicolateral em arco aberto na nervura central e no pecíolo, bem como caule com floema interno, fibras e células pétreas são caracteres marcantes em *E. pyriformis*. Embora esses aspectos sejam comuns ao gênero, possuem fácil reconhecimento microscópico e, quando considerados em conjunto, favorecem o controle farmacognóstico da espécie.

Na prospecção fitoquímica foram encontrados glicosídeos flavônicos e esteroides e/ou triterpenoides particularmente no extrato hidroalcoólico de folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos foram detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule. Foram isolados cinco compostos no presente estudo, dentre os quais apenas três foram identificados. Os compostos isolados e identificados foram relatados pela primeira vez na espécie. Dos compostos isolados, um deles foi a β -amirina, que pertence à classe dos terpenoides, sendo classificada como um triterpeno, e dois derivados porfirínicos, que são denominados de feofitina *a* e feofitina *b*.

Os compostos encontrados no óleo essencial, em sua maioria são derivados terpênicos, como os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, e alguns sesquiterpenos, que não puderam ser identificados.

Na atividade antioxidante com DPPH, observou-se que o extrato etanólico bruto e as frações clorofórmica, de acetato de etila e hidroalcoólica de folha e o extrato etanólico bruto e a fração clorofórmica de caule têm atividade antioxidante igual aos padrões (vitamina C e rutina), e a fração de acetato de etila possui atividade antioxidante maior com relação às demais amostras. Testando o extrato etanólico bruto e frações com o complexo fosfomolibdênio, concluiu-se que em geral

apresentam atividade antioxidante, porém são menos ativos que os padrões, excetuando-se o extrato etanólico bruto de folha e caule e a fração de acetato de etila de folha, que possuem atividade um pouco superior à da rutina.

Na atividade antimicrobiana, constatou-se que o extrato etanólico bruto de folha apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As frações de acetato de etila e hidroalcoólica de folha apresentam atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*, e na fração de acetato de etila de folha foi observada uma maior inibição contra *S. aureus*. O extrato etanólico bruto de caule apresenta inibição contra *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. O extrato bruto e frações de caule não apresentam atividade de importância. Com relação ao extrato acetônico bruto de folha e caule, este apresenta atividade contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis*.

No teste de citotoxicidade frente a *Artemia salina*, observou-se que as frações clorofórmica e de acetato de etila de folha e as frações hexânica, de acetato de etila e hidroalcoólica de caule apresentam atividade citotóxica com DL_{50} inferiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Na alelopatia, nenhuma das amostras apresenta influência sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa*. As amostras não diferem estatisticamente dos controles e não revelam atividade sobre o crescimento nem do hipocótilo nem da radícula das sementes de *L. sativa*. Somente a fração hexânica de caule inibiu o crescimento da radícula em proporção maior e na concentração de 0,4 mg. Com relação aos resultados, estudos mais específicos são sugeridos, bem como com relação aos compostos isolados, pois as substâncias quando interagem em conjunto podem ocasionar resultados alelopáticos negativos.

Ao investigar diferentes aspectos de *E. pyriformis*, este trabalho possibilitou o acréscimo de dados ao conhecimento da flora brasileira e à essa planta medicinal e potencial droga vegetal. Os resultados inéditos obtidos com relação à espécie são promissores e favorecem a perspectiva da continuidade desses estudos, objetivando-se a identificação dos compostos que não foram nominados e também a realização das atividades biológicas dos compostos isolados, por meio de novas técnicas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E. L. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 241-8, 2008.
- APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia beaurepaireana* and *Eugenia pyriformis*: Section *Dichotomae*. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 16, n. 3, p. 191-2, 2004.
- APG II - An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. **Botanical Journal of the Linnean Society**, New York, v. 141, p. 399-436, 2003.
- APPENDINO, G.; GIBBONS, S.; GIANA, A.; PAGANI, A.; GRASSI, G.; STAVRI, E. S.; RAHMAN, M. M. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 71, n. 8, p. 1427-30, 2008.
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, New York, v. 85, p. 827-34, 2007.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 55-61, 2003.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, I. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 26, n 1, p. 76-81, 2007.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S. S.; CHVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 90-7, 2008.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1.

BENFATTI, C. S.; CORDOVA, S. M.; GUEDES, A.; MAGINA, M. D. A.; CORDOVA, C. M. M. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de moliculite. **Revista Pan-Amazônica de saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 33-9, 2010.

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

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 30. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1994.

BORMANN, D. **Efeito do déficit hídrico em características químicas e bioquímicas da soja e na degradação da clorofila, com ênfase em metabólitos incolores**. São Paulo, 2009. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos alimentos, Universidade de São Paulo.

BRANDÃO, M. **Plantas medicamentosas do cerrado mineiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 15-20, 1991.

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

BUSSMANN, R. W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; CHAIT, G.; DÍAZ, D.; POURMAND, K.; JONAT, B.; SOMOGY, S.; GUARDADO, G.; AGUIRRE, C.; CHAN, R.; MEYER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A.; EFFIO-CARBAJAL, J.; FRÍAS-FERNANDEZ, F.; BENITO, M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 132, p. 101–8, 2010.

CÂMARA, C. A. G.; DIAS, I. J. M.; OLIVEIRA, R. N. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 657-69, 2006.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae.** Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Eight edition.** v. 29, n. 2, M07-A8, 2009.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determinations.** Boca Raton: Taylor & Francis, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. v. 1.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T., PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal.** São Paulo: Roca, 1987.

DEZANI, S. ;GUIDETTI, E. **Trattato di farmacognosia.** Torino: Torinese, 1953.

DIAS, J. F. G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus* Willd.** Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 42, p. 1005-10, 1996.

DOLPHIN, D. **The porphyrins - Physical Chemistry.** Part C (vol. V). New York: Academic Press, 1978.

DOMINGUES, E. A.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, M. C.; TEIXEIRA, T. S.; PEIXOTO, J. L. B.; SARRAGIOTTO, M. H.; VIDOTTI, G. J. Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.20, n. 1, p. 23-7, 2010.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 426-43, 2007.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Anatomia foliar de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 759-70, 2009.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, p. 711-3, 1998.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blücher, 1974.

F. BRAS. IV- **Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERNANDEZ-FERREIRA, F.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, R. O. A.; BRANQUINHO, L. F.; RAMOS, M. F. S., HENRIQUES, M. G. M. O.; SIANI, A. C.; GOMES, S. M.; SOMAVILHA, N. S. D. N.; BEZERRA, K. M. G.; MIRANDA, S. C. M.; CARVALHO, P. S.; RIBEIRO, D. G. Avaliação da atividade de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Burseraceae como agentes tripanossomicidas. **III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**. CPQBA. UNICAMP. Campinas, 2009.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**. Pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 23, n. 4, p. 213-26, 2008.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University, 1956.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA, M. T.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2008.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA, M. T.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; CARMO-FILHO, J. R.; PIMENTA, F. C. Antimicrobial activity of the crude ethanol extract and fractions from *Eugenia uniflora* leaves against *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 28, n 6, p. 892-8, 2009.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. Barcelona: Labor, 1988.

FONTENELLE, G. B.; COSTA, C. G.; MACHADO, R. D. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Botanical Journal of Linnean Society**, London, v. 115, p. 111-33, 1994.

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

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 338-43, 2005.

GIOTTO, A. C.; OLIVEIRA, S. C. C.; SILVA, J. G. P. Efeito alelopático de *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC. Berg. (Myrtaceae) na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 600-2, 2007.

GOMES, S. M.; SOMAVILHA, N. S. D. N.; BEZERRA, K. M. G.; MIRANDA, S. C. M.; CARVALHO, P. S.; RIBEIRO, D. G. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 223-38, 2009.

GUIMARÃES, A. C. Avaliação da atividade de óleos essenciais de espécies de Myrtaceae e Burseraceae como agentes tripanossomicidas. In: **Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 3., 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 1997.

HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. **Boletín**

de la **Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires, v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.

HOLETZ, F. B., *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HUANG, X.; LI, M.; XU, B.; ZHU, X.; DENG, Z.; LIN, W. Proteasome and NF- κ B Inhibiting Phaeophytins from the Green Alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, Basel, v. 12, p. 587-92, 2007.

HUSSEIN, S. A. M.; HASHEM, A. N. M.; SELIEM, M. A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M. A. M. Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, New York, v. 64, p. 883-9, 2003.

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

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 11. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia*- MYRTACEAE). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 30, n.1, p. 49-57, 2000.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. 3rd ed. **Plant systematics**: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer, 2008.

JUNGES, J. J.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES-FILHO, E. The use of ¹³C and ¹H-NMR in the structural elucidation of a new *nor*-lupane triterpene. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 317-20, 1999.

KONEMMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWWEL-JUNIOR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico** – texto e atlas colorido. 2. ed. São Paulo: Medicina Panamericana, 1993. p. 458-79.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H-S.; SUBBARAJU, G. V. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **International Journal of Applied Science and Engineering**, Taiwan, v. 3, n. 2, p. 125-34, 2005.

LEGRAND, D. C.; KLEIN, R. M.; **Flora ilustrada catarinense: Mirtáceas**. Itajaí: P. Raulino Reitz, 1969.

LORCA, G. G.; AMAT, A. G.; GONZALES, C. Análisis comparativo de caracteres diagnósticos para la identificación de tres especies argentinas de Myrtaceae empleadas en la medicina popular. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 14, n. 2, p. 81-6, 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1.

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

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J. L. B.; SILVA, C. C.; SHUQUEL, I. T. A.; BASSO, E. A.; VIDOTTI, G. J. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 12, p. 180-3, 2001.

MA, L.; DOLPHIN, D. The metabolites of dietary chlorophylls. **Phytochemistry**, New York, v. 50, p. 195-202, 1999.

MAGINA, M. A., GILIOLI, A., MORESCO, H. H., COLLA, G., PIZZOLATTI, M. G., BRIGHENTE, I. M. C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, La Plata, v. 29, n. 3, p. 376-82, 2010.

MAGUIRE, J. D. Speed germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madson, v. 2, n. 2, p. 176-7, 1962.

MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, New York, v. 37, n. 6, p. 1517-75, 1994.

MAHMOUD, I. I., MARZOUK, M. S. A., MOHARRAM F. A., EL-GINDI M. R., HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 58, p. 1239-44, 2001.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. **Alelopatia**: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-23.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 61-9, 2006.

MARQUEZ-LANFER, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v. 39, n. 3, p. 229-42, 2003.

MEDEIROS, J. D. Anatomia foliar de *Eugenia umbelliflora* Berg (Myrtaceae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 13, n.1, p. 7-20, 2000.

MEDEIROS, L. L.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 559, p. 227-35, 2007.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITAO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127-30, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon, 1950. v. 1, p. 621-31.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, p. 31-4, 1982.

MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie**. Jena Fischer, 1937.

MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; COSTA-BRIGHENTE, I. M. An application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 21, n. 3, p. 175-8, 2002.

MONTEIRO, S. **Brasileiríssima, Uvaia**. Disponível em: < http://www.ibraf.org.br/x_files/revista10.pdf > Revista Frutas e Derivados – Ano 3 – edição 10 – junho de 2008 –página 13. Acesso em: 15/05/2009.

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

NAGASAMPAGI, M. S. **Chemistry of natural products**. Nova Dehli: Narosa Publishing, 2004.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p. 368-73, 1964.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, I. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. M. Studies on the essential oil composition, antibacterial, cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, p. 147-52, 2005.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1989.

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

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-7, 2008.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F. MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium Kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 507, p. 253-59, 2005.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, p. 337-41, 1999.

RAMFUL, D.; AUMJAUD, B.; NEERGHEEN, V. S.; SOOBRAATTEE, M. A.; GOOGOLYE, K.; ARUOMA, BAHORUM, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. **Food Research International**, Ottawa, p. 1-7, 2010.

REVILLA, J. **Plantas úteis da bacia amazônica**. Rio de Janeiro: Inpa, 2002.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984.

RISCH, N.; BROCKMANN, H. Chlorophyll B. totalzuordnung des ^{13}C -NMR spectrums. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 173-6, 1983.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-6, 1972.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 529-48, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de planta**. Viçosa: UFV, 2001.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radical-scavenging behaviour of some North-East Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, New York, v. 114, p. 693-5, 2009.

SANTOS, A. K. L.; COSTA, J. G. M. MENEZES, I. R. A.; CANSANÇÃO, I. F.; SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; COUTINHO, H. D. M. Antioxidant activity of five Brazilian plants used as traditional medicines and food in Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 6, n. 24, p. 335-8, 2010.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; DAMIÃO, A. O.; BARROS, T. F.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de

Avicennia schaueriana Stapf & Leechm. ex Moldenke, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 124-9, 2010.

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

SAUSEN, T. L.; LÖWE, T. R.; FIGUEIREDO, L. S.; BUZATTO, C. R. Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret. **Polibotânica**, México, n. 27, p. 145-58, 2009.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E. B.; ARIAS, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 21, p. 183-6, 1987.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophyll in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Fort Lauderdale, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SCHWIKKARD, L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura Fischeri*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 8, p. 2391-4, 1998.

SHIOI, Y.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K.; SHIMOKAWA, K. Breakdown of chlorophylls by soluble proteins extracted from leaves of *Chenopodium album*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 145, n. 4, p. 416-21, 1995.

SHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and method of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, Norwich, v. 13, n. 11, p. 361-71, 2002.

SILVA, C. J. **Morfoanatomia foliar e composição química dos óleos essenciais de sete espécies de *Melaleuca* L. (Myrtaceae)**. Viçosa, 2007. Dissertação – Programa de Pós - graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; MALUF, A. M.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 213-21, 2003.

SILVA, R. S. M. **Caracterização de sub-populações de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) da região sudeste do estado de Goiás, Brasil.** Goiânia, 1999. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, F. X.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Estudo anatômico comparativo do lenho e da casca de duas espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 175-84, 1999.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

SOUZA, F. H. T. **Estudo fitoquímico e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae).** João Pessoa, 2009. Dissertação (Mestrado) Produtos naturais e biossintéticos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Prof. Delby Fernandes de Medeiros" - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática.** Nova Odessa: Plantarum, 2005.

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

STEFANELLO, M. E. A.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; CERVI, A. C. Composição química e variação sazonal dos óleos essenciais de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, La Plata, v. 28, n. 3, p. 449-53, 2009.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E. B.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 24, p. 179 -83, 1988.

THOMAS, H.; OUGHAM, H.; HÖRTENSTEINER, S. Recent advances in the cell biology of chlorophyll catabolism. **Advances in Botanical Research**, Birmingham, v. 35, p. 1-52, 2001.

WALLER, G. R. Introduction. In: MACIAS, F. A.; GALINDO, J. C. G.; MOLINILLO, J. M.G., CUTLER, H. G. (Eds.) **Recent advances in allelopathy**. Cadiz: Serv. Pub. Univ. Cadiz, 1999. v. 1.

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**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 77-81, 1963.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Breve análise histórica da química das plantas medicinais**: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-23.