UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA JUNQUEIRA GATTO

ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, MYRTACEAE

CURITIBA

2018

LARISSA JUNQUEIRA GATTO

ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, MYRTACEAE

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

Orientador: Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Prof° Dr° Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2018

Gatto, Larissa Junqueira
Estudo fitoquímico, morfoanatômico, atividades biológicas e propriedades antioxidantes da espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, Myrtaceae / Larissa Junqueira Gatto – Curitiba, 2018.
139 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Myrtaceae. 2. Ácido gálico. 3. Toxicidade. 4. Alelopatia. 5. Hemólise. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.42

Maria da Conceição Kury da Silva – CRB – 9/1275

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LARISSA JUNQUEIRA GATTO** intitulada: **Estudo Fitoquímico, Morfoanatômico, Atividades Biológicas e Propriedades Antioxidantes da Espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, Myrtaceae**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 21 de Fevereiro de 2018.

MARILIS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIANDRADE)

DEISE PREHS MONTRUCCHIO
Avaliador Externo (UFPR)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - Curitiba - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Dedico este trabalho às minhas seis pessoas preferidas no mundo: Carmem, Mauro, Melissa, Vinicius, Vó Cida e Vô Tião (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, agradeço a todo momento.

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel, pela oportunidade de orientação, pelas conversas e trocas de experiências, pelo tempo dedicado às correções, por acreditar e confiar em mim, deixando-me confortável na condução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, por se fazer presente durante toda a pesquisa, sempre preocupado com as novas moléculas e disposto a ajudar no que fosse preciso.

Ao Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais, professores, técnicos e alunos de mestrado e doutorado, pela amizade, compartilhamento de conhecimentos, contribuições científicas e pelos momentos que estivemos juntos.

À Natasha Fabri, pela parceria nos experimentos durante todo o trabalho. Dividimos nossas alegrias, dificuldades, preocupações, além dos dias em que madrugamos ou ficamos até tarde no laboratório, para que os resultados fossem os mais confiáveis e coerentes possíveis. Também compartilhamos muitas conversas, maçãs verdes e, acima de tudo, uma grande amizade.

Às amigas e mestrandas Natasha Stopinski e Camila de Jesus, pelo companheirismo, auxílio nos experimentos, por tornarem o dia a dia mais leve e divertido.

À doutoranda Katlin Rech, pela ajuda desde o início, da rotina do laboratório às contribuições de RMN e CLAE.

À doutoranda Vanessa Bobek, pelo auxílio no estudo morfoanatômico, sendo sempre gentil e paciente em me ensinar e tirar todas as dúvidas.

Ao doutorando Francis Merino, por seu tempo e empenho na aquisição dos espectros de RMN. Ao Prof. Dr. Andersson Barison, pela ajuda na interpretação e discussão dos resultados.

À Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias e aos doutorandos Carolina Sette, Gustavo Bellei e Leticia Freire, pelo auxílio com os métodos biológicos, estatísticos e discussão dos resultados. À Profa. Josiane, também agradeço a oportunidade e experiência do estágio em docência.

À Profa. Dra. Deise Montrucchio e ao Prof. Dr. Vinicius Bednarczuk, pelas valiosas contribuições e correções do trabalho. Ao Prof. Vinicius, também agradeço pelo auxílio com a análise de CLAE e discussão da substância isolada.

À técnica Maria da Graça, pela ajuda com os equipamentos da Central Analítica e ao secretário da pós-graduação, Jean Godoi.

Ao curador do MBM, José Tadeu Weidlich Motta, pela identificação da espécie.

Ao departamento de química da UFPR, pela realização das análises de RMN, CG-EM (Meira Ballesteros) e Difratometria de raio X de monocristal (Francielli Santana).

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Mauro e Carmem, por serem exemplos de vida, por todos os esforços, valores e conhecimentos transmitidos, por priorizarem a minha educação, por estarem ao meu lado, apoiando minhas escolhas. À minha irmã, Melissa, pela torcida, conselhos e, principalmente, companheirismo. À Vó Cida, pelas muitas orações nos momentos em que mais precisei.

Ao meu marido, Vinicius, pelo incentivo e entusiasmo à pesquisa, por ter efetivamente participado deste trabalho, seja contando sementes para o teste de alelopatia, digitando dados no Excel, levando-me a Universidade aos domingos, lendo textos intermináveis. Pela preocupação com o meu conforto físico e emocional, e por abdicar de alguns planos para que eu pudesse realizar o mestrado.

RESUMO

A espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand (Myrtaceae) é nativa e endêmica do Brasil, tendo ocorrência confirmada nos estados do Sul. O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico, morfoanatômico e avaliar as propriedades antioxidantes e atividades biológicas, visto ser apenas uma das muitas espécies da biodiversidade brasileira sem respaldo científico documentado na literatura. O material vegetal foi coletado em Curitiba, Paraná, Brasil e identificado por comparação no Museu Botânico Municipal. O estudo morfoanatômico foi realizado por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, além da realização de testes histoquímicos. A folha apresentou estômatos paracíticos e nervura central com formato côncavo-convexo. Houve a presença de tricomas tectores, drusas de oxalato de cálcio e compostos fenólicos nas folhas, pecíolos e galhos. No screening fitoquímico foi observada a presença de compostos fenólicos e esteroides e/ou triterpenos. O óleo essencial foi extraído por Clevenger, resultou em um rendimento de 0,17% e seus compostos majoritários foram trans-Calameneno, E-Cariofileno e Espatulenol. A extração das folhas e galhos foi realizada por Soxhlet e após o fracionamento, resultaram-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. A partir da fração folha acetato de etila foi isolado e identificado o ácido gálico. Os testes antioxidantes por formação do complexo fosfomolibdênio e redução do radical DPPH• apresentaram significativa atividade, com destaque para as frações folha e galho acetato de etila. No ensaio de toxicidade *in vitro* frente à *Artemia salina*, o óleo essencial foi considerado moderadamente tóxico. Na alelopatia, houve inibição do crescimento do hipocótilo e radícula nos extratos brutos e frações de folhas e galhos, além do óleo essencial. Obteve-se atividade hemolítica na faixa de 50% na concentração de 1000 µg/mL da fração folha hexano e óleo essencial. Considerando a presença do constituinte ácido gálico, as propriedades antioxidante e alelopática demonstradas pelos extratos brutos e frações, bem como a toxicidade do óleo essencial, estudos de aplicações diversas podem ser aprofundados posteriormente para o enriquecimento da pesquisa desta espécie.

Palavras-chaves: Óleo essencial. Ácido gálico. Toxicidade. Alelopatia. Hemólise.

ABSTRACT

The species *Myrcia hatschbachii* D. Legrand (Myrtaceae) is native and endemic to Brazil, having confirmed occurrence in the Southern States. The aim of this research was to realize phytochemical, morphological and anatomical studies, and evaluate antioxidant properties and biological activities, as this is only one of many species that compose brazilian biodiversity without any scientific study documented in literature. The plant material was collected in Curitiba, Parana, Brazil and identified by comparison in Museu Botânico Municipal (Municipal Botanical Museum). The morphological and anatomical studies were performed by using optical and electronic microscopy, on top of histochemical tests. The leaf presented paracitic stomata and central nervure with concave-convex format. Tector trichomes, calcium oxalate druses and phenolic compounds were present on leaves, stems and branches. By using phytochemical screening, it was observed that phenolic compounds and steroids and/or triterpenes were present. The essential oil was extracted by using Clevenger apparatus, resulting in yield of 0.17% and its main compounds were trans-Calamenene, E-Caryophylene and Spathulenol. Extractions from leaves and branches were obtained via Soxhlet and after fractioning, resulted in hexane, chloroform, ethyl acetate and remaining hydroalcoholic fractions. From the leaf ethyl acetate fraction was isolated and identified gallic acid. The antioxidant capacity by formation of phosphomolybdenum complex and DPPH• radical scavenging method presented significant activity, with special emphasis in leaf and branch ethyl acetate fraction. In the test for *in vitro* toxicity towards *Artemia salina*, the essential oil was considered moderately toxic. In the allelopathic study, there was growth inhibition in hypocotyl and radicle in crude extracts and fractions from leaves and branches, and also essential oil. Hemolytic activity was found in the 50% range at 1000 µg/mL of leaf hexane fraction and essential oil. Considering the presence of the gallic acid, the antioxidant and allelopathic properties demonstrated by the crude extracts and fractions, as well as the essential oil toxicity, several applications studies can be further developed to enrich the research of this species.

Keywords: Essential Oil. Gallic acid. Toxicity. Allelopathy. Hemolisis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand NO BRASIL.....30

FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand.....30

FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA 31

FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DAS FOLHAS COLETADAS DE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand.....32

FIGURA 5 - FOTOGRAFIAS DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand NO LOCAL DA COLETA.....32

FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, NÚMERO 72379.....33

FIGURA 7 - VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii*.....63

FIGURA 8 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DE *Myrcia hatschbachii*.....64

FIGURA 9 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA: TESTES HISTOQUÍMICOS.....66

FIGURA 10 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *Myrcia hatschbachii*.....68

FIGURA 11 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE DE *Myrcia hatschbachii*.....69

FIGURA 12 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii*.....76

FIGURA 13 - COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii*.....78

FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO.....81

FIGURA 15 - DIAGRAMA ORTEP DA ESTRUTURA DE $C_7H_6O_5.H_2O$ INDICANDO O ESQUEMA DE NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS..83

FIGURA 16 - CANAL OBSERVADO NA FORMA POROSA DE ÁCIDO GÁLICO MONOHIDRATADO.....84

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H (CD_3OD-*d4*, 200 MHz) DO CRISTAL ISOLADO.....85
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}C\{^{1}H\}$ (CD_3OD-*d4*, 50 MHz) DO CRISTAL ISOLADO.....85
FIGURA 19 - DISPOSIÇÃO DOS ÁTOMOS DE CARBONO NA MOLÉCULA DE ÁCIDO GÁLICO.....86
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA E SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL DO CRISTAL ISOLADO.....88
FIGURA 21 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DO EXTRATO BRUTO FOLHA.....89
FIGURA 22 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DA FRAÇÃO FOLHA CLOROFÓRMIO.....90
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA E SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL DA FRAÇÃO FOLHA ACETATO DE ETILA.....91

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT.....95

GRÁFICO 2 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À RUTINA.....96

GRÁFICO 3 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C).....96

GRÁFICO 4 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•.....97

GRÁFICO 5 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•.....98

GRÁFICO 6 - FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*.....106

GRÁFICO 7 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO IVG DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*.....109

GRÁFICO 8 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*.....112

GRÁFICO 9 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE GALHOS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*.....112

GRÁFICO 10 - FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM POSITIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*.....113

GRÁFICO 11 - AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*.....114
GRÁFICO 12 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*.....117
GRÁFICO 13 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE GALHOS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*.....117
GRÁFICO 14 - AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*.....118
GRÁFICO 15 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO TRITON 1%.....124
GRÁFICO 16 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS À ÁGUA POTÁVEL.....125
GRÁFICO 17 - CURVAS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii*.....125

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROPRIEDADES MEDICINAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE.....26
QUADRO 2 - TAXONOMIA DO GÊNERO *Myrcia* DC.....27
QUADRO 3 - REATIVOS PARA O TESTE HISTOQUÍMICO.....35
QUADRO 4 - COMPOSIÇÃO DE FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....51
QUADRO 5 - MÉTODO POR GRADIENTE EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD.....53
QUADRO 6 - REAÇÃO REALIZADA NO TESTE DE HEMÓLISE.....60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....70

TABELA 2 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....71

TABELA 3 - RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GALHOS.....71

TABELA 4 - RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS.....73

TABELA 5 - RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO AQUOSO.....74

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....77

TABELA 7 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE TEOR DE SÓLIDOS NOS EXTRATOS BRUTOS.....80

TABELA 8 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET.....81

TABELA 9 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A PESQUISA DE METABÓLITOS NO COMPOSTO ISOLADO.....82

TABELA 10 - PARÂMETROS DE CÉLULA UNITÁRIA UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALINA.....83

TABELA 11 - DADOS DE RMN DE ^{1}H E $^{13}C\{^{1}H\}$ PARA O CRISTAL ISOLADO, EM CD_3OD.....86

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT.....93

TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À RUTINA.....93

TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C).....94
TABELA 15 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E PADRÕES....100
TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• DE ÓLEO ESSENCIAL.....101
TABELA 17 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....104
TABELA 18 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO IVG DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....107
TABELA 19 - INFLUÊNCIA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* NO IVG DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....109
TABELA 20 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....110
TABELA 21 - INFLUÊNCIA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....113
TABELA 22 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....115
TABELA 23 - INFLUÊNCIA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO.....118
TABELA 24 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* EM *Artemia salina*.....120
TABELA 25 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE AMOSTRAS DE *Myrcia hatschbachii* FRENTE AO TRITON 1%.....122
TABELA 26 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE AMOSTRAS DE *Myrcia hatschbachii* FRENTE À ÁGUA POTÁVEL.....123

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA - Atividade antioxidante
AAR - Atividade antioxidante relativa
Abs - Absorbância
AG - Ácido gálico
AH - Atividade hemolítica
BHT - Hidroxitolueno butilado
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM - Cromatografia gasosa / Espectrometria de massas
CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CL_{50} - Concentração letal 50%
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI - Clinical Laboratory Standarts Institute
DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EBF - Extrato bruto folha
EBG - Extrato bruto galho
ERO - Espécies reativas de oxigênio
DMSO - Dimetilsulfóxido
FAA - Solução de formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%
FFA - Fração folha acetato de etila
FFC - Fração folha clorofórmio
FFH - Fração folha hexano
FFR - Fração folha remanescente
FGA - Fração galho acetato de etila
FGC - Fração galho clorofórmio
FGH - Fração galho hexano
FGR - Fração galho remanescente
g - Gramas
HC_{50} - Concentração hemolítica 50%
IC_{50} - Concentração inibitória 50%
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

INPI	-	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IVG	-	Índice de Velocidade de Germinação
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitros
m/m	-	Massa/ Massa
m/v	-	Massa/ Volume
n°	-	Número
N	-	Normal
OE	-	Óleo essencial
ORTEP	-	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
PBS	-	Phosphate-buffered saline
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
TMS	-	Tetrametilsilano
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
UV	-	Ultravioleta
v/v	-	Volume/ Volume
%	-	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
1.1 OBJETIVO GERAL 23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
2 REVISÃO DA LITERATURA 24
2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE 24
2.2 GÊNERO *Myrcia* DC. 27
2.3 ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand 29
3 MATERIAL E MÉTODOS 31
3.1 MATERIAL VEGETAL 31
3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO 34
3.2.1 Preparo de lâminas semipermanentes 34
3.2.2 Preparo de lâminas permanentes 35
3.2.3 Técnica de diafanização ou clareamento 35
3.2.4 Testes histoquímicos 35
3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura 36
3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 36
3.3.1 Umidade (Perda por dessecação) 36
3.3.2 Cinzas totais 37
3.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA 37
3.4.1 Extrato hidroalcoólico 38
3.4.1.1 Pesquisa de alcaloides 38
3.4.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas 39
3.4.1.3 Pesquisa de heterosídeos flavônicos 39
3.4.1.4 Pesquisa de cumarinas 40
3.4.1.5 Pesquisa de compostos iridoides 40
3.4.1.6 Pesquisa de antraquinonas 41
3.4.1.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos 41
3.4.2 Extrato aquoso 42
3.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos 42
3.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos 43
3.4.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos 43
3.4.2.4 Pesquisa de taninos 44

3.4.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis....45
3.4.2.6 Pesquisa de ácidos fixos....45
3.4.2.7 Pesquisa de amino grupo....46
3.5 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL....46
3.5.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial....47
3.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA: OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES....47
3.6.1 Preparo do Extrato bruto....47
3.6.1.1 Teor de sólidos....48
3.6.1.2 Fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico....49
3.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA: ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO....49
3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada....50
3.7.2 Difratometria de raios X de monocristal....51
3.7.3 Ressonância Magnética Nuclear....52
3.7.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência....52
3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE....53
3.8.1 Formação do complexo fosfomolibdênio....53
3.8.2 Redução do radical DPPH•....54
3.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS....56
3.9.1 Atividade alelopática....56
3.9.1.1 Procedimento para extrato bruto e frações....56
3.9.1.2 Procedimento para óleo essencial....57
3.9.1.3 Germinação....57
3.9.1.4 Crescimento....58
3.9.2 Toxicidade preliminar *in vitro*....58
3.9.3 Atividade hemolítica *in vitro*....59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO....62
4.1 MATERIAL VEGETAL....62
4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO....62
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS....70
4.3.1 Umidade (Perda por dessecação)....70
4.3.2 Cinzas totais....70
4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA....71
4.4.1 Extrato hidroalcoólico....71
4.4.2 Extrato aquoso....74

4.5 ÓLEO ESSENCIAL 75
4.5.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial 75
4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA: EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES 79
4.6.1 Preparo do extrato bruto e determinação do teor de sólidos das partes aéreas 79
4.6.2 Preparo das frações 80
4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA: ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO 81
4.7.1 Cromatografia em Camada Delgada 82
4.7.2 Difratometria de raios X de monocristal 83
4.7.3 Ressonância Magnética Nuclear 84
4.7.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 87
4.7.5 Ácido gálico 91
4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 92
4.8.1 Formação do complexo fosfomolibdênio 92
4.8.2 Redução do radical DPPH• 97
4.8.3 Discussão dos resultados de atividades antioxidantes 101
4.8.4 Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos 102
4.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 103
4.9.1 Atividade alelopática 103
4.9.1.1 Germinação e IVG 104
4.9.1.2 Hipocótilo 110
4.9.1.3 Radícula 114
4.9.1.4 Discussão dos resultados de atividade alelopática 119
4.9.2 Toxicidade preliminar *in vitro* 120
4.9.3 Atividade hemolítica *in vitro* 121
5 CONCLUSÃO 126
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 127
REFERÊNCIAS 128
ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO 139

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais extraídos de plantas são importantes na descoberta de novos fármacos, como modelos de desenvolvimento para a síntese de moléculas com propriedades farmacológicas. A natureza tem sido responsável por muitas substâncias orgânicas conhecidas, pois tem contribuído significativamente com o fornecimento de metabólitos secundários, os quais podem ser utilizados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica. Também são empregados na obtenção de ativos ou precursores e como matéria-prima na manipulação, possuindo as mais variadas finalidades terapêuticas (PINTO et al., 2002).

A pesquisa fitoquímica objetiva o conhecimento e avaliação da presença de constituintes químicos dos vegetais, indicando o grupo de substâncias majoritárias da espécie. Assim, as análises são direcionadas para o isolamento, purificação e identificação estrutural destes compostos (FOGLIO et al., 2006), podendo representar um modelo molecular de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos.

Neste cenário, o Brasil possui uma extensa biodiversidade, compreendendo grande parte da flora mundial e sendo um dos maiores detentores de várias espécies vegetais. O país também apresenta alta taxa de endemismo biológico, localizados em seus biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pantanal e Pampas (JOLY et al., 2011; PINTO et al., 2012).

A maioria das espécies de plantas encontradas no Brasil e no mundo não possuem estudos químicos, biológicos ou farmacológicos que permitam e delimitem o controle de qualidade da planta por meio da elaboração de monografias oficiais. Estes estudos devem comprovar suas propriedades terapêuticas. A utilização de fitoterápicos, muitas vezes, está fundamentada no uso tradicional e não apresenta respaldo científico quanto à eficácia e segurança de uso (YUNES et al., 2001).

Mesmo com esta biodiversidade, a pequena exploração dos recursos naturais é um desperdício para a pesquisa científica. O arsenal terapêutico pouco estudado restringe o uso de matéria-prima vegetal - do mesmo modo que o desmatamento e a exploração não sustentável prejudicam a pesquisa de novas moléculas.

A busca por substâncias bioativas, a partir de plantas, contribui para um promissor crescimento de exportação dos insumos oriundos de produtos naturais de origem brasileira (BARREIRO; BOLZANI, 2009), representando uma fonte de expansão econômica e geração de patentes. Além disto, esta busca também se

justifica pela quantidade de substâncias ativas derivadas de vegetais que possuem comprovada eficácia e são indispensáveis no tratamento de doenças. Assim, novas espécies de plantas podem ser estudadas para a pesquisa de compostos terapêuticos no combate a epidemias mundiais e doenças negligenciadas.

As perspectivas apresentadas mostram o interesse na pesquisa de espécies vegetais, ainda sem estudo. Pois, a riqueza vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, uma variedade de moléculas a serem descobertas. Por se tratar de uma família com quimiotaxonomia de interesse científico, a pesquisa de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand é uma forma de contribuir com o estudo de componentes químicos já que a planta não apresenta descrição fitoquímica de seus metabólitos e estudos de suas propriedades biológicas e antioxidantes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico aplicado às atividades biológicas e propriedades antioxidantes das folhas e galhos de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand (Myrtaceae).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento da espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, gênero *Myrcia* DC. e Família Myrtaceae.
- Solicitar autorização de pesquisa e exsicata para identificação da espécie.
- Avaliar a morfoanatomia foliar e caulinar.
- Realizar estudo fitoquímico preliminar das partes aéreas.
- Obter óleo essencial das folhas e identificar os constituintes químicos.
- Obter os extratos e frações das partes aéreas.
- Isolar e identificar os compostos químicos presentes nas partes aéreas por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos, frações e óleo essencial.
- Avaliar atividade alelopática dos extratos brutos, frações e óleo essencial.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* dos extratos brutos, frações e óleo essencial.
- Avaliar a atividade hemolítica dos extratos brutos, frações e óleo essencial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

Myrtaceae é uma família pertencente as Angiospermas, contendo cerca de 5500 espécies, divididas em duas subfamílias, 17 tribos e 140 gêneros. É distribuída majoritariamente no Hemisfério Sul, com diversidade destacada nas regiões tropicais e subtropicais, como América do Sul, Austrália e Ásia (ROSA; ROMERO, 2012; RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2015).

As duas subfamílias existentes são Myrtoideae e Leptospermoideae. Estas são reconhecidas por seus frutos e folhas. Na Myrtoideae, ou também chamada de tribo Myrteae, ocorre a presença de frutos carnosos e folhas opostas; já a subfamília Leptospermoideae, possui folhas alternadas e frutos secos (SOBRAL, 2003). Todas as mirtáceas brasileiras pertencem a tribo Myrteae, sendo uma das famílias mais importantes do país, com destaque para os gêneros *Eugenia, Myrcia* e *Calyptranthes* (GRESSLER et al., 2006).

No Brasil, a família possui aproximadamente 23 gêneros e 1033 espécies nativas. Possuem ocorrência confirmada em todos os estados, sendo a região Sudoeste com maior número de nomes de espécies aceitos. Suas formas de vida são de arbusto, árvore, erva, trepadeira, subarbusto e possuem domínio fitogeográfico na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e Pantanal (SOBRAL et al., 2015).

Embora haja esta grande quantidade de gêneros e espécies, o único estudo observado sobre a descrição da família Myrtaceae, pelo território nacional, ocorreu em meados de 1858. Posteriormente, foram realizados estudos regionais e algumas revisões, apresentando progressos na elucidação das espécies brasileiras. Porém, muitas regiões do país são escassamente pesquisadas, havendo muitas espécies desconhecidas (SOBRAL, 2008). A taxonomia da tribo Myrtae resulta em erros ou falta de identificação de espécies em inventários florísticos, dificultando iniciativas de conservação. Florestas atlânticas e savanas brasileiras, onde Myrtae apresenta de 10 a 15% de sua diversidade, são regiões que sofrem alta ameaça ambiental de desmatamento (VASCONCELOS et al., 2015).

Em relação às características morfológicas, as espécies da família podem apresentar tricomas unicelulares; folhas opostas com glândulas translúcidas, inflorescências terminais ou axilares (SOBRAL, 2003).

As flores das mirtáceas brasileiras são hermafroditas, geralmente pequenas, de coloração branca, com estames numerosos e ovários ínferos. Suas pétalas, estames e aroma, descrito como doce, estão envolvidos na atração visual e olfativa de polinizadores. A polinização das flores pode ocorrer por insetos, como as abelhas, e também pelo vento e por aves, sendo estas menos evidenciadas. Já os frutos, contém sementes envolvidas por uma polpa carnosa rica em água e carboidratos e com poucos lipídeos e proteínas. Seu tamanho e cor são bastante variáveis, com predomínio da cor preta. Outra característica dos frutos é que a maioria dos gêneros produzem poucas sementes, as quais são potencialmente dispersas por vertebrados frugívoros (GRESSLER et al., 2006).

Os metabólitos secundários presentes em mirtáceas são caracterizados pela presença de compostos fenólicos (flavonoides e taninos) e óleo essencial. Vários flavonoides possuem atividade antioxidante, reduzindo radicais livres, e são quelantes metálicos; já os taninos hidrolisáveis e condensados vem sendo estudados devido a sua potencial atividade antibacteriana (MORAIS RODRIGUES, DE et al., 2016).

A família Myrtaceae possui competências econômicas importantes, sendo suas espécies utilizadas para fins terapêuticos, ornamentação, obtenção de frutos, madeira e papel (MORESCO et al., 2014). A espécie *Syzygium aromaticum* (cravo da índia) pode ser empregada na forma de especiaria, a madeira da espécie *Eucalyptus* spp é usada para obtenção de papel. Há muitas espécies frutíferas que apresentam grande aproveitamento e comercialização, como *Eugenia uniflora* (pitanga), *Psidium guajava* (goiaba) e *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba).

Como uso medicinal, a família destaca-se pelo grande número de espécies utilizadas pela população brasileira para este fim. Suas folhas são empregadas em tratamentos gastrointestinais, hemorrágicos, doenças infecciosas, sendo a ação relacionada possivelmente às propriedades adstringentes. Algumas aplicações terapêuticas de diferentes gêneros estão destacadas no QUADRO 1 (CRUZ; KAPLAN, 2004).

QUADRO 1 - PROPRIEDADES MEDICINAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE

ESPÉCIES	PARTES	USOS
Blepharocalyx salicifolius	Folhas	Diarreia, leucorreia, uretrite
Blepharocalyx tweediei	Folhas	Leucorreia, reumatismo, pressão baixa
Calyptranthes aromatica	Folhas, cascas	Antiespasmódico, vermífugo
Calycorectes psidiiflorus	Folhas	Digestão, pressão alta, colesterol
Campomanesia guazumifolia	Folhas	Males do fígado
Campomanesia xanthocarpa	Folhas	Colesterol, diurético, circulação, diarreia
Campomanesia coerulea	Frutos, cascas	Colagogo, digestivo
Campomanesia aurea	Folhas	Males da bexiga, uretra, diarreia
Eucalyptus sp.	Folhas, cascas	Febre, garganta, bronquite, expectorante
Eugenia brasiliensis	Cascas, folhas	Diurético, antirreumático
Eugenia cauliflora	Cascas	Asma, diarreia, dor de garganta
Eugenia cf. biflora	Folhas	“Doença da mulher”
Eugenia dysenterica	Frutos, folhas	Prisão de ventre, rins, cicatrizante
Eugenia jambos	Folhas	Diabetes, adstringente
Eugenia jambolana	Folhas	Diabetes
Eugenia punicifolia	Folhas, raízes	Febre, resfriado, diabetes, fígado
Eugenia sulcata	Folhas	Febre, diarreia em crianças
Eugenia supra-axillaris	Folhas	Diarreia
Eugenia uniflora	Folhas	Gota, reumatismo, febre, gripe, colesterol
Hexachlamys edulis	Folhas	Diabetes, digestivo, ácido úrico
Marliera tomentosa	Cascas	Disenteria, adstringente
Myrcia amazônica	Folhas	Leucemia
Myrcia bracteata	Folhas	Assadura, pós-parto, diarreia
Myrcia sphaerocarpa	Folhas	Diabetes
Myrciaria tenella	Folhas	Adstringente, asseio pós-parto
Myrtus rubra	Folhas	Piorreia, tártaro
Plinia trunciflora	Caule	Males da visão, asma
Psidium cattleyanum	Brotos, cascas	Males das vias urinárias, hemorragias
Psidium cinereum	Frutos	Hemorragias
Psidium firmum	Folhas	Adstringente
Psidium cf. guianense	Folhas	Anti-inflamatório
Psidium guajava	Folhas, cascas	Diarreia, dor de garganta, leucorreia
Stenocalyx sp.	Folhas, frutos	Febre, hipertensão, diurético, escabiose
Syzygium cumini	Folhas, cascas	Diabetes, diarreia
Syzygium jambolanum	Folhas	Diabetes, hemorroida, gases, diarreia

FONTE: Adaptada de CRUZ; KAPLAN (2004).

No que se refere às atividades dos óleos essenciais, a maioria das espécies da família apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas, sendo capazes de inibir o crescimento de micro-organismos relacionados à pele, cárie dentária e deterioração de alimentos, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os óleos também demonstraram atividades citotóxicas, antioxidantes, larvicidas, anti-inflamatórias e analgésicas (STEFANELLO et al., 2011).

2.2 GÊNERO *Myrcia* DC.

O gênero *Myrcia* DC. pertence a subfamília Myrtoideae, tribo Myrteae e subtribo Myrciinae. É um dos maiores gêneros da família Myrtaceae e possui mais de 300 espécies do México ao sul do Brasil (LIMBERGER et al., 2004).

No Brasil, o gênero possui aproximadamente 262 espécies nativas. Há registros de ocorrência em todos os estados, sendo as regiões Sudoeste e Nordeste com maior número de nomes de espécies aceitos. Suas formas de vida são de arbusto, árvore, trepadeira, subarbusto e possuem domínio fitogeográfico na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa e Pantanal (SOBRAL et al., 2015).

Os níveis de organização do gênero são apresentados no QUADRO 2.

QUADRO 2 - TAXONOMIA DO GÊNERO *Myrcia* DC.

HIERARQUIA	TAXONOMIA
Gênero	*Myrcia*
Subtribo	Myrciinae
Tribo	Myrteae
Subfamília	Myrtoideae
Família	Myrtaceae
Ordem	Myrtales
Reino	Plantae

FONTE: SOBRAL (2003); LIMBERGER et al. (2004).

Em relação às suas características morfológicas, as inflorescências são panículas, raramente espigas ou racemos; as bractéolas são persistentes ou decíduas; presença de flores pentâmeras, com pétalas, lobos individualizados no cálice, ovário locular. Os frutos são seminados e as sementes possuem embrião mircioide. Os pontos chave para identificação do gênero são as inflorescências racemos, flores axilares e folhas ovadas e sésseis (SOBRAL, 2003).

As espécies do gênero *Myrcia* DC. possuem propriedades de uso popular, sendo utilizados como hipoglicemiantes, diuréticos, adstringentes e em tratamentos de hipertensão, úlcera e hemorragia (CERQUEIRA et al., 2009; SERPELONI et al., 2015).

O uso tradicional associado mais citado do gênero (tratamento de diabetes) está relacionado a um grupo denominado no Brasil de "pedra-hume-caá" ou “insulina vegetal”. Fazem parte deste grupo: *Myrcia punicifolia, Myrcia speciosa, Myrcia*

amazonica, Myrcia citrifolia, Myrcia guianensis, Myrcia salicifolia, Myrcia sylvatica e Myrcia uniflora (SILVA et al., 2015).

Outras espécies são descritas na literatura com usos tradicionais, como a utilização de *Myrcia uniflora* para o tratamento de diarreia, hemorragia, enterites e aftas, *Myrcia salicifolia* para feridas e úlceras bucais, *Myrcia bracteata* para dispepsia e *Myrcia ovata* no tratamento de doenças gástricas e diarreia (CASCAES et al., 2015).

A produção de óleos essenciais pode ser obtida a partir de folhas, frutos, flores e caules de *Myrcia* DC. Os principais constituintes químicos encontrados nestes óleos são mono e sesquiterpenos (STEFANELLO et al., 2010). A análise química de óleos essenciais de espécies nativas do Rio Grande do Sul demonstraram predominância de sesquiterpenos cíclicos, sendo que as principais vias de ciclização foram as do cadinamo, germacrano e cariofilano (LIMBERGER et al., 2004).

Várias espécies de *Myrcia* tem sido estudadas e a composição de óleo essencial de suas folhas são reportadas na literatura, incluindo *Myrcia acuminatissima, Myrcia bombycina, Myrcia fallax, Myrcia glabra, Myrcia multiflora, Myrcia bracteata, Myrcia cuprea, Myrcia sylvatica, Myrcia arborescens, Myrcia lajeana, Myrcia obtecta, Myrcia oligantha, Myrcia pubipetala, Myrcia rostrata, Myrcia selloi, Myrcia richardiana e Myrcia laruotteana* (COLE et al., 2008).

Estudos biológicos de óleo essencial de espécies do gênero, tem mostrado a presença de atividades relevantes, como antimicrobiana e antifúngica (CÂNDIDO et al., 2010; CORREA-ROYERO et al., 2010), anti-inflamatória e antinociceptiva (ANDRADE et al., 2012; SANTOS, et al., 2014), atividade larvicida (LIMA et al., 2011) e atividade antiproliferativa contra células cancerígenas (STEFANELLO et al., 2011).

Amostras de óleo essencial de *Myrcia alagoensis*, *Myrcia guianensis* e *Myrcia rostrata* foram testadas frente à bactérias (*Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa) e* leveduras (*Candida albicans* e *Candida parapsilosis*), sendo capazes de inibir o crescimento destes micro-organismos (SILVA, 2010).

Na composição química das espécies do gênero já foram encontrados flavonoides, terpenoides, acetofenonas, taninos e ácidos orgânicos (MORESCO et al., 2014). Em estudos, foram relatadas a presença de eucaliptina (flavona) na espécie *Myrcia citriofolia;* myrciacitrinas I e II (flavonas glicosiladas) e myrciafenonas A e B (acetofenonas glicosiladas) na espécie *Myrcia multiflora* (CERQUEIRA et al., 2009). Alguns terpenoides, como ácido betulínico, ácido oleanoico e ácido ursólico foram

obtidos de *Myrcia myrtillifoli;* e terpenos, como a casuarina, foram observados na espécie *Myrcia palustris* (CASCAES et al., 2015).

Em relação aos efeitos farmacológicos do gênero, extratos de folhas e compostos isolados de *Myrcia multiflora* mostraram redução do nível de glicose em sangue de ratos, incluindo inibição das α-glicosidases intestinais (GHANI, 2015). Além deste, outros estudos apresentaram a ação de flavonoides e derivados de acetofenonas na inibição de α-glicosidases (YOSHIKAWA et al., 1998; WUBSHET et al., 2015; GONZÁLES et al., 2016). Estes compostos poderiam explicar a potencial atividade hipoglicêmica e o uso popular de algumas espécies no tratamento da diabetes.

Outros estudos e atividades relatadas estão relacionados a antiobesidade (FERREIRA et al., 2011), atividade anti-hemorrágica (SOUSA et al., 2013), antioxidante (SALVADOR et al., 2011), possível indução do hipotireoidismo (FERREIRA et al., 2006), efeito hepatoprotetor (FERREIRA et al., 2010) e efeitos fitotóxicos e alelopatia.

Nos estudos alelopáticos, observou-se que a espécie *Myrcia tomentosa* inibe o crescimento de outras plantas ao seu redor, em regiões de cerrado, indicando a produção de substâncias alelopáticas que alteram o desenvolvimento de outras espécies. Ensaios apontaram a presença de flavonoides, os quais são responsáveis pela presença de atividade fitotóxica, mostrando que esta espécie pode ser utilizada na produção de herbicidas naturais (IMATOMI et al., 2013). A espécie *Myrcia guianensis* também apresenta ocorrência no cerrado brasileiro e mostrou atividade alelopática para o seu óleo essencial e frações (FRANCO et al., 2015).

2.3 ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand

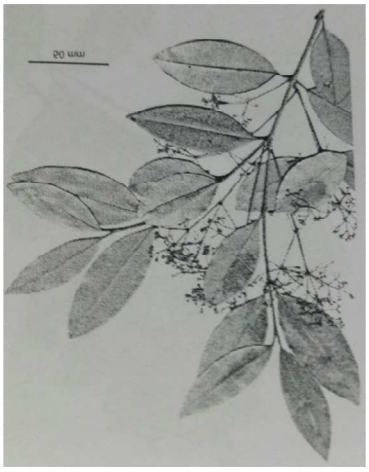
A espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand é nativa e endêmica do Brasil, tendo ocorrências confirmadas nos estados da região Sul (FIGURA 1) e domínio fitogeográfico na Floresta Atlântica. A espécie não apresenta sinônimos descritos na literatura e é conhecida popularmente como Caingá (SOBRAL et al., 2015).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand NO BRASIL

FONTE: SOBRAL et al. (2015).

Em relação aos aspectos morfológicos, a espécie é uma árvore que pode chegar a 15 metros de altura. Possui folhas lanceoladas ou oblongo-lanceoladas; ápice agudo a longo-acuminado, sendo este o ponto chave para sua identificação; base cuneada ou obtusa; nervuras central, secundária, terciária, marginal. Presença de córtex rugoso. As inflorescências são panículas axilares, com 20 ou mais flores; pedicelos geralmente ausentes; botões florais obovados ou obovado-oblongos; ovário mais piloso que o cálice; lobos do cálice arredondados, desiguais; ocorrem nos arredores do mês de dezembro. Os frutos são globosos e vermelhos (quando maduros), possuem de 5 a 7 mm de diâmetro e ocorrem nos arredores do mês de fevereiro (SOBRAL, 2003). A FIGURA 2 apresenta uma ilustração da espécie *Myrcia hatschbachii* D. Legrand.

FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand

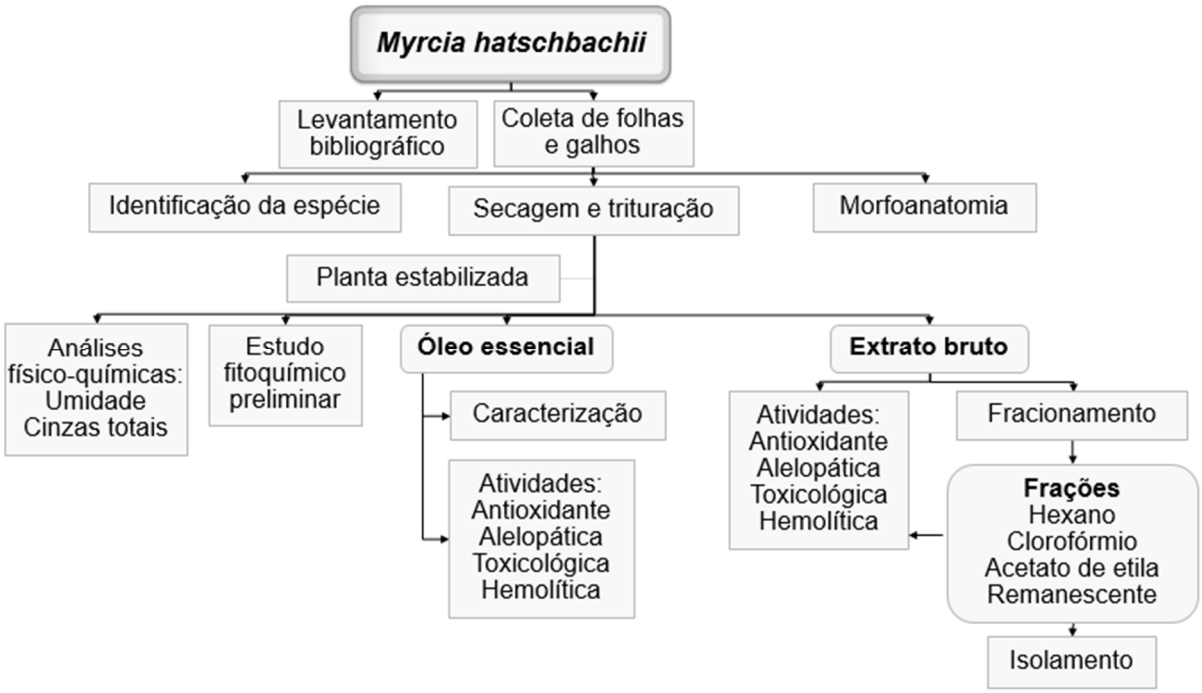


FONTE: SOBRAL (2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir é apresentado um fluxograma resumido, FIGURA 3, com as etapas de procedimentos e execuções da pesquisa a partir da espécie vegetal.

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: O autor (2016).

3.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas (2,7 Kg) e galhos (3,5 Kg) de *Myrcia hatschbachii* foram coletadas de três indivíduos no capão do Cifloma, localizado no campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, município de Curitiba, Paraná, nas coordenadas geográficas 25°26’S e 49°14’W, no mês de abril de 2016. Na FIGURA 4 há um exemplar de suas folhas e a FIGURA 5 mostra fotografias no local da coleta.

FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DAS FOLHAS COLETADAS DE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand

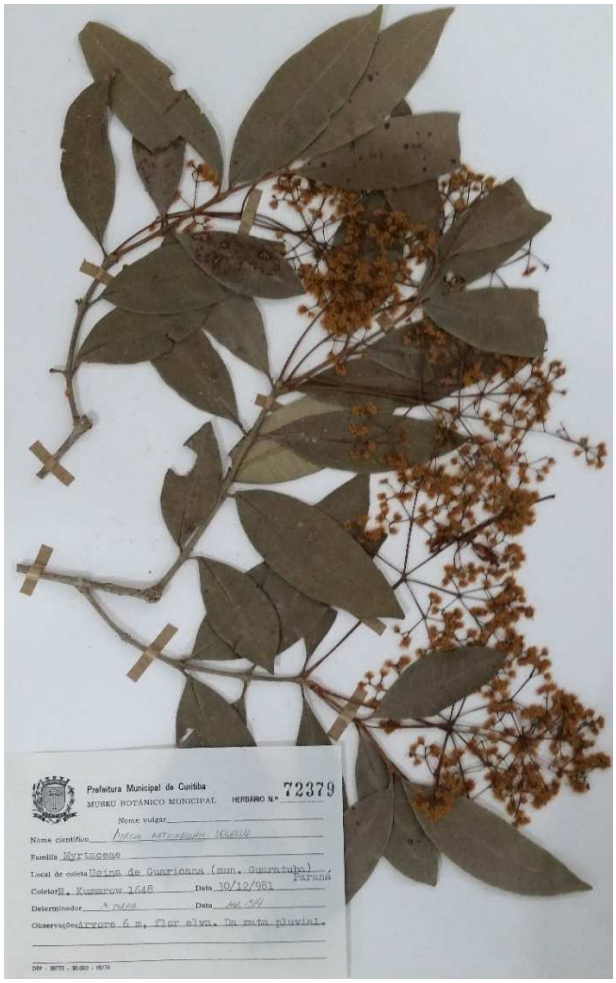
FONTE: O autor (2016).

FIGURA 5 - FOTOGRAFIAS DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii* D. Legrand NO LOCAL DA COLETA

FONTE: O autor (2016).

Do material coletado, foi confeccionada uma exsicata e sua identificação foi feita pelo curador José Tadeu Weidlich Motta do Herbário Museu Botânico Municipal, o qual é credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN). O exemplar foi determinado por comparação com o exemplar de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand tombado no Herbário sob o número 72379, apresentado na FIGURA 6.

FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Myrcia hatschbachii* D. LEGRAND, NÚMERO 72379



FONTE: O autor (2016).

A utilização da espécie em estudo possui autorização de acesso ao patrimônio genético concedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através do projeto “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais” constante no processo de nº 02001.001165/2013-47 (ANEXO 1).

A secagem do material vegetal coletado foi realizada separadamente para folhas (com pecíolos) e galhos, em ambiente com sombra e circulação de ar, obtendo estes dois materiais como objetos de estudo.

Após a secagem, os dois materiais foram triturados com o auxílio de um moinho de facas e martelos para a realização dos estudos descritos posteriormente, resultando em 2430,1 g de galhos secos e 1744,9 g de folhas secas. Estas quantidades foram utilizadas nas análises físico-químicas, ensaio sistemático em análise fitoquímica e obtenção de extrato bruto para os galhos e análises físico-químicas, ensaio sistemático em análise fitoquímica, obtenção de óleo essencial, e obtenção de extrato bruto para as folhas.

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Os marcadores morfoanatômicos são aqueles relacionados ao padrão fenotípico de uma dada característica e este estudo tem como principal objetivo a identificação correta da espécie, assim como a descrição de seus aspectos morfológicos e estruturas de caracterização e anatomia foliares. Alguns exemplos de marcadores que podem ser observados no estudo são o formato da nervura central, formato do caule, aspecto geral do pecíolo, tipo de estômato.

Folhas e galhos frescos foram coletados e fixados em solução de FAA, composto de formaldeído, ácido acético e etanol 70%, na proporção 0,5:0,5:9 (v/v). Esta fixação preserva as estruturas celulares, bloqueando o seu metabolismo e processos vitais de autólise (JOHANSEN, 1940). Após uma semana de fixação, as folhas e galhos foram estocados em etanol 70% (BERLYN; MIKSCHE, 1976) até o preparo das lâminas utilizadas na identificação das estruturas por microscopia, realizado na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.2.1 Preparo de lâminas semipermanentes

As lâminas semipermanentes foram obtidas através de secções transversais e cortes paradérmicos, à mão livre (OLIVEIRA; AKISUE, 1997), os quais foram corados pela técnica de dupla coloração, com azul de astra e fucsina básica (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). Com o azul de astra é possível corar celulose e xilema, já com a fucsina básica é possível visualizar fibras esclerenquimáticas e floema. Para a montagem das lâminas foi utilizada glicerina 50%, com a função de manter os cortes hidratados (BERLYN; MIKSCHE, 1976). A lutagem foi realizada com esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976).

3.2.2 Preparo de lâminas permanentes

A técnica de inclusão em parafina foi realizada para a preparação das lâminas permanentes (CAPUTO; GINTINARA; MANSO, 2011), a partir do material vegetal previamente fixado e armazenado em etanol 70%. Neste material foram feitas secções de 7-9 µm no plano transversal em micrótomo rotatório Spencer 820. As secções foram hidratadas, distendidas em lâminas e secas em mesa térmica a 40ºC. Para a coloração empregou-se azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972) e como meio de montagem foi usado o Entellan®.

3.2.3 Técnica de diafanização ou clareamento

O material vegetal foi seccionado e deixado em água em vidro de relógio. Em seguida, foi clarificado em placa de Petri, utilizando como alvejante uma solução de hipoclorito de sódio por um período de 24 horas.

Após o clareamento, a amostra foi lavada com água destilada por 6 vezes de 15 em 15 minutos. Para neutralizar o pH, o material foi lavado em uma solução de ácido acético 5%, lavado novamente em água destilada e corado com safranina 1%. Foi efetuado o processo de montagem da lâmina com glicerina 50% (FUCHS, 1963).

3.2.4 Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material fixado e utilizados os reativos conforme o QUADRO 3.

QUADRO 3 – REATIVOS PARA O TESTE HISTOQUÍMICO

COMPOSTOS	REATIVO	REFERÊNCIA
Compostos fenólicos	Cloreto férrico	JOHANSEN, 1940
Lipídeos	Sudam III	SASS, 1951
Lignina	Floroglucina clorídrica	FOSTER, 1949
Amido	Lugol	BERLYN; MIKSCHE, 1976
Cristais	Ácido sulfúrico	OLIVEIRA; AKISSUE, 1997

FONTE: O autor (2016).

Os resultados foram registrados através de fotomicrografias em microscópio óptico acoplado à câmera digital.

3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

Foi realizada a análise ultra estrutural de superfície por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em alto vácuo. Com esta análise é possível observar o tipo de cutícula, características do caule, tipo e forma de cristal. Para tal procedimento, as amostras foram fixadas em FAA 70, desidratadas em série etanólica crescente (80%, 90%, 100%) e pelo ponto crítico, e na sequência foi realizada a metalização, a qual é uma deposição de metal na amostra para dar condutibilidade aos elétrons.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.3.1 Umidade (Perda por dessecação)

A determinação de umidade é realizada com a finalidade de determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada.

O método de escolha para avaliação de umidade na espécie *Myrcia hatschbachii* está descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Previamente a realização das análises, 3 cadinhos foram identificados e dessecados (triplicata). Amostras de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), aproximadamente 3 g, foram colocadas nos cadinhos dessecados, e posteriormente pesados. Estes cadinhos foram levados a estufa por 2 horas em temperatura de 100ºC. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos foram novamente pesados até observação de peso constante.

Posteriormente, foi calculado a porcentagem de umidade em relação ao material vegetal original através da fórmula (1):

$$(1)\quad \%\ \text{de umidade} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

Onde:

P1 = Peso do cadinho com amostra após a dessecação em estufa;

P2 = Peso do cadinho com amostra antes da dessecação em estufa;

P3 = Peso da amostra inicial.

3.3.2 Cinzas totais

A determinação de cinzas totais é realizada com a finalidade de estabelecer a quantidade de substâncias inorgânicas não voláteis obtidas no processo de incineração.

O método de escolha para avaliação de cinzas totais na espécie *Myrcia hatschbachii* está descrito na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010).

Previamente a realização das análises, 3 cadinhos foram identificados, dessecados, resfriados e pesados (triplicata). Amostras de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), aproximadamente 3 g, foram colocadas uniformemente nos cadinhos dessecados, os quais foram levados a incineração por 6 horas em mufla, com aumento gradativo de temperatura até 600 ± 25ºC, tornando-se cinzas. Após o resfriamento em dessecador, estes cadinhos contendo resíduos foram novamente pesados.

Posteriormente, foi calculado a porcentagem de cinzas totais em relação ao material vegetal original através da fórmula (2):

$$(2)\quad \%\ \text{de cinzas totais} = [(P2 - P1) / P3] \times 100$$

Onde:
P1 = Peso do cadinho após a dessecação e resfriamento em dessecador;
P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e resfriamento em dessecador;
P3 = Peso da amostra inicial.

3.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica é realizado com a finalidade de caracterizar qualitativamente os principais grupos ativos do metabolismo secundário da espécie vegetal em estudo.

Para elaboração destes testes, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003). A partir do material vegetal seco e triturado, foram preparados extratos hidroalcoólico e aquoso de folhas e galhos, os quais passaram por reações colorimétricas ou precipitação.

Os componentes químicos pesquisados no extrato hidroalcoólico foram: alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, compostos iridoides, antraquinonas, esteroides e/ou triterpenos. Já no extrato aquoso: heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogênicos, taninos, amino grupos, ácidos fixos, ácidos voláteis.

3.4.1 Extrato hidroalcoólico

O preparo do extrato hidroalcoólico foi realizado a partir de 40 g de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), o qual foi macerado com 200 mL de etanol 70%, em banho-maria a 70°C por 1 hora. Este macerado resultante foi filtrado em papel de filtro.

Em seguida, o extrato hidroalcoólico foi fracionado. Esta partição ocorreu em funil de separação, com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Por meio da solubilidade, estes solventes utilizados no particionamento orientam a pesquisa dos compostos químicos, em relação à sua estrutura molecular.

No funil de separação, contendo o extrato hidroalcoólico, foram adicionados 40 mL do primeiro solvente, hexano. O funil foi agitado, ocorrendo a separação da fração dissolvida. Esta etapa foi repetida por 5 vezes; e completou-se o volume da fração com o solvente extrator para 200 mL. Este procedimento foi repetido com o clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se 200 mL de cada fração. O resíduo do extrato foi chamado de fração hidroalcoólica remanescente, e seu volume completado para 200 mL com etanol 70%. As frações foram mantidas refrigeradas até a realização das pesquisas de cada marcador.

3.4.1.1 Pesquisa de alcaloides

Os alcaloides são compostos básicos e sua solubilidade varia de acordo com variações no pH. A pesquisa qualitativa se baseia na capacidade de combinação dos alcaloides, em estado de sal (extratos ácidos), com o iodo e metais pesados (bismuto, mercúrio, tungstênio), formando precipitados coloridos.

Nesta técnica, 50 mL de cada umas frações foi levada a secura em banho-maria a 70°C e os resíduos foram dissolvidos em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido

clorídrico 1%. Para cada fração testada, foi transferido 1 mL para 4 tubos de ensaio. O quarto tubo foi utilizado como controle negativo, contendo somente o extrato clorídrico. Nos demais tubos, foram adicionadas duas gotas dos reativos gerais para alcaloides: Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio), Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) e Bouchardart (iodo-iodeto de potássio).

O aparecimento de precipitado de diferentes colorações indica reação positiva para alcaloides, sendo branco para o reativo de Mayer, cor tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

3.4.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

As leucoantocianidinas são flavonoides monoméricos 3,4-diois. A reação se explica pela redução da leucoantocianidina em antocianidina, na presença de ácido clorídrico, com alteração de coloração de amarelo para vermelho.

Para esta reação, foram transferidos 10 mL de frações hexano, clorofórmio e acetato de etila para cápsulas de porcelana, as quais foram levadas a secura. A fração remanescente hidroalcoólica também teve seu volume transferido, porém não necessitava de concentração. Em seguida, foram adicionados 5 mL de etanol, 5 gotas de ácido clorídrico e as 4 cápsulas foram levadas a ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva.

3.4.1.3 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

Foram realizadas duas técnicas para identificação de flavonoides.

a) Pesquisa de flavonoides

Em banho-maria, cápsulas contendo 20 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas a secura e posteriormente, redissolvidas com 10 mL de etanol. Em seguida, foram transferidos 5 mL de cada uma das frações, inclusive a remanescente hidroalcoólica que não necessita ser seca, para tubos de ensaio.

Os tubos de ensaio foram colocados na capela em um béquer contendo gelo, devido a ocorrência de uma reação exotérmica na etapa posterior. Assim, foram adicionados 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante, lentamente. A reação positiva desenvolve coloração rosa.

b) Teste do oxálico bórico ou Reação de Taubock

Em banho-maria, cápsulas contendo 10 mL das frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila foram levadas a secura. Ao resíduo, foram adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg de mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), os quais foram levados a secura e redissolvidos com 5 mL de éter etílico. Este volume foi transferido para tubos de ensaio para visualização de fluorescência em câmara de luz ultravioleta A reação positiva desenvolve fluorescência amarela esverdeada, explicada pela formação de quelatos.

3.4.1.4 Pesquisa de cumarinas

Para esta análise, 30 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram concentradas em banho-maria até volume de 5 mL cada. Na remanescente hidroalcoólica, 30 mL da fração foi acidificada até pH 1,0 com ácido clorídrico e posteriormente, foi também concentrada até volume de 5 mL. Após o resfriamento, a fração remanescente concentrada foi transferida para funil de separação e extraída com 2 porções de 10 mL de éter etílico. As frações etéreas das duas extrações foram misturadas e evaporadas em banho-maria até volume de 5 mL.

Foram colocados 3 mL de cada fração (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etérea) em tubos de ensaio e posteriormente, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 1N recém preparado. Os tubos foram levados para uma câmara de luz ultravioleta em 366 nm, ficando expostos em repouso por 15 minutos. Para reação positiva é observada o aparecimento de fluorescência azul ou verde amarelada.

3.4.1.5 Pesquisa de compostos iridoides

Os iridoides são substâncias que normalmente apresentam dez átomos de carbono e podem ser divididos em iridoides glicosídeos, secoiridoide glicosídeo e iridoides não glicosídeos. Para a pesquisa qualitativa, foram preparadas 3 reações de identificação.

Na primeira reação, foram transferidos 2 mL de frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila para tubos de ensaio. Aos tubos, foram adicionados pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 mL de ácido

clorídrico reagente. O desenvolvimento de coloração verde escura indica reação positiva.

Na segunda reação, foram transferidos 2 mL de frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila para tubos de ensaio. Aos tubos, foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico reagente e o desenvolvimento de coloração rosa violáceo indica reação positiva.

Na terceira reação, foram transferidos 2 mL de frações remanescente hidroalcoólica, hexano, clorofórmio e acetato de etila para tubos de ensaio. Aos tubos, foram adicionados 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 1% e duas gotas de ácido sulfúrico reagente. O desenvolvimento de coloração rosa cereja indica reação positiva.

3.4.1.6 Pesquisa de antraquinonas

Antraquinonas e naftoquinonas são polifenóis que em solução alcalina formam fenolatos hidrossolúveis com coloração rósea, devido à presença de hidrogênio ácido nas hidroxilas fenólicas que reagem com a solução alcalina.

Balões de fundo chato foram levados à fervura contendo 30 mL de cada fração e 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 10%. As soluções contidas nos balões, acoplados a um condensador de bolas, foram deixadas em refluxo por 30 minutos e decorrido este tempo, foram adicionados em cada balão, 30 mL de água destilada.

A fração remanescente hidroalcoólica foi transferida para funil de separação para extração com 2 porções de 10 mL de éter etílico.

O extrato etéreo e as demais frações foram concentradas em banho-maria, até um volume de 5 mL, os quais foram transferidos para tubos de ensaio. Nos tubos foram adicionados 5 mL de hidróxido de amônia, sob lenta agitação para realização da Reação de Borntraeger. A reação é considerada positiva para antraquinonas e/ou naftoquinonas com observação de coloração vermelha.

3.4.1.7 Pesquisa de esteroides e/ou triterpenos

Para a pesquisa de esteroides e/ou triterpenos foram realizados duas técnicas.

a) Reação de Liberman-Bouchard

Foram evaporadas até secura em banho-maria, 30 mL de cada fração. Os resíduos foram, posteriormente, redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e em seguida, foram pipetados 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico de cada fração para 3 tubos de ensaio. Os volumes foram completados para 2 mL com clorofórmio.

Para esta reação, na capela, foram adicionados aos tubos de ensaio, 1 mL de anidrido acético e, lentamente, 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6 do anel aromático. A coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre 5 e 6 do anel aromático. O desenvolvimento de coloração amarela possivelmente indica um grupamento metila no carbono de posição 14.

b) Reação de Keller Kelliani

Em quatro tubos de ensaio, foram transferidos 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, e remanescente hidroalcoólica, os quais foram levados à secura. Após, os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1% e transferidos para tubos de ensaio já contendo 2 mL de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos ou na fase acética indica reação para desoxiaçúcares, sendo azul para esteroides e verde para triterpenos.

3.4.2 Extrato aquoso

O preparo do extrato aquoso foi realizado a partir de 40 g de cada material vegetal (folhas ou galhos secos e triturados), o qual foi macerado com 200 mL de água destilada, em banho-maria a 70°C por 1 hora. Este macerado resultante foi filtrado e completado o volume para 200 mL do mesmo solvente extrator, lavando o material.

3.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

As antocianinas estão presentes nas plantas na forma de sais como pigmentos hidrossolúveis, os quais são encontrados principalmente nas flores, frutos e tecidos. Apresentam colorações que se modificam com variações no pH. Em

presença de base, as antocianinas reagem com as hidroxilas fenólicas livres e apresentam coloração azul, devido a estrutura quinoide. Já com ácidos, há a formação de sais de oxônio que são corados em vermelho.

Nesta técnica, 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para 3 tubos de ensaio. O primeiro tubo foi acidificado até pH 4,0. O desenvolvimento de coloração em tons avermelhados indica reação positiva. O segundo tubo foi alcalinizado até pH 10,0. O desenvolvimento de coloração em tons azulados indica reação positiva. O terceiro tubo de ensaio foi neutralizado até pH 7,0. O desenvolvimento de coloração em tons violáceos indica reação positiva.

O desenvolvimento de coloração verde em algum dos 3 tubos indica a presença de flavonoides.

3.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

As saponinas esteroidais possuem características de formação de espuma estável devido a elevada tensão superficial e propriedades de hemolizar os glóbulos vermelhos. Elas são esteroides glicosídeos com presença de um núcleo epirostano.

Para a pesquisa qualitativa, foi colocada a mesma quantidade de extrato aquoso em 2 tubos de ensaio. Os tubos foram agitados energicamente com movimentos succionais por 5 minutos, e deixados em repouso por 30 minutos. A altura do anel de espuma formada é medida após a agitação e após o repouso. A reação é considerada positiva quando a altura do anel for persistente e superior a 1 cm.

3.4.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Nesta técnica, foi utilizada a reação de isopurpurato de sódio, a qual se baseia na formação de isopurpurato alcalino, a partir do ácido pícrico, na presença de liberação de ácido cianídrico.

Foram transferidos para tubo de ensaio, cuidando para não umedecer as paredes do tubo, 5 mL do extrato aquoso e 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Uma tira de papel picro sódio foi suspensa com o auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que a tira não entrasse em contato com o extrato.

O papel pricro sódio é preparado a partir de tiras de papel de filtro embebidas em ácido pícrico 1%, as quais são secas ao abrigo da luz. Em seguida, as tiras são embebidas em solução de carbonato de sódio 10% e secas ao abrigo de luz.

O tubo de ensaio contendo o extrato aquoso e reagentes foi levado a banho-maria a 60°C por 30 minutos. O desenvolvimento de coloração avermelhada no papel picro-sódico indica reação positiva.

3.4.2.4 Pesquisa de taninos

Para a pesquisa de taninos, foi realizada a reação de Cloreto férrico e a reação com formol clorídrico (Ensaio de Staniasny), onde são identificados a presença de taninos condensados e hidrolisáveis.

Taninos condensados ou proantocianidinas são derivados de catecois, produtos do metabolismo do fenilpropanol e possuem a característica de não serem hidrolisados por ácidos. Taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos fenólicos, como ácido gálico e ácidos elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato.

a) Cloreto férrico

Os taninos são facilmente oxidados por influência de metais, como o cloreto férrico. Para esta pesquisa, 1 mL de extrato aquoso e 5 gotas de cloreto férrico 1% foram adicionados em tubo de ensaio. O desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos, coloração verde indica flavonoides e marrom indica polifenóis.

b) Reação com formol clorídrico (Reação de Staniasny)

Em balão de fundo chato, foram adicionados 30 mL do extrato aquoso, 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. O balão foi acoplado ao condensador de bolas e levado a refluxo por 1 hora. Após resfriamento, o extrato formol-clorídrico foi filtrado e reservado para a pesquisa de taninos hidrolisáveis.

O material retido no filtro foi lavado com uma solução de etanol 50% e acrescido de gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Ao gotejar o hidróxido de potássio, o desenvolvimento de coloração verde indica reação positiva para taninos condensados.

No filtrado reservado, foi adicionado excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Ao adicionar o cloreto férrico, o desenvolvimento de coloração azul indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

3.4.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Ácidos voláteis são líquidos voláteis ou gases, os quais podem ser evaporados e caracterizados por destilação. Nesta técnica, 10 mL de extrato aquoso foram acidificadas com 1 mL de ácido sulfúrico 1N em tubo de ensaio, cuidando para não umedecer a parede do tubo. Uma tira de papel tornassol foi suspensa com o auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que a tira não entrasse em contato com o extrato. O tubo foi levado em banho-maria a 60°C por 30 minutos e a presença de ácidos voláteis é observada em coloração avermelhada na fita.

3.4.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Ácidos fixos são líquidos ou sólidos pouco voláteis. Nesta técnica, foi transferido para um balão de fundo chato, 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo por 30 minutos. Decorrido o tempo, o balão foi resfriado, seu conteúdo acidificado com ácido sulfúrico 1N e extraído, em funil de separação, com 3 porções de 10 mL de éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, sendo posteriormente filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C. O resíduo foi deixado em estufa a 100°C por 10 minutos. Em seguida, foi resfriado, 5 mL de hidróxido de amônio 1N foram adicionados, e a solução foi filtrada.

Em uma tira de papel de filtro, foram feitas 3 manchas. A primeira continha apenas o extrato amoniacal, a segunda continha extrato amoniacal e reativo de Nessler e a terceira continha apenas reativo de Nessler. O desenvolvimento de coloração diferente na segunda mancha, em relação à primeira e a terceira, indica reação positiva para a presença de ácidos fixos.

3.4.2.7 Pesquisa de amino grupo

Nesta técnica, 10 mL de extrato aquoso foram concentrados até 5 mL, em banho-maria a 60°C. Em uma tira de papel de filtro, foram adicionadas 5 gotas de extrato aquoso concentrado e em cima da mancha, foi gotejado reativo de Ninhidrina. Uma segunda mancha foi feita no papel apenas com o reativo de Ninhidrina, utilizado para controle. A fita foi levada a estufa a 100°C por 10 minutos e o desenvolvimento de coloração azul violácea indica reação positiva para a presença de amino grupos.

A ninhidrina, um agente oxidante, transforma o grupo amino de alfa amino ácido, oxidando-o, em grupo amino e hidrindantina. O imino ácido formado se decompõe em amônia. A hidrindantina reage com a amônia formando um complexo de coloração púrpura, o qual reage com outra amônia formando o complexo final de coloração azul escuro.

3.5 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial das folhas de *Myrcia hatschbachii* foi obtido através do aparelho Clevenger modificado por Wasicky (1963), baseando-se na técnica descrita na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). A extração foi realizada por hidrodestilação por arraste de vapor d'água.

Em um balão de fundo chato, foram adicionados 600 g de material vegetal (folhas secas e trituradas), adicionando-se quantidade suficiente de água destilada para cobrir o material e permitir a extração (3500 mL). O balão foi acoplado ao Clevenger e mantido sob manta de aquecimento a uma temperatura aproximada de 100ºC. Assim que a primeira gota de óleo foi visualizada no tubo separador com escala graduada, o tempo de destilação foi marcado em 6 horas.

Decorrido o tempo da extração, foi realizada a leitura do volume do óleo essencial diretamente na escala do tubo separador do aparelho de Clevenger e, posteriormente calculado o rendimento (3) em mililitros (mL%) de óleo essencial por 100 g da droga:

$$(3)\ \text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Volume obtido de óleo essencial em mL}}{\text{Massa de material vegetal moído em g}} \times 100$$

O óleo obtido foi acondicionado e mantido em freezer, ao abrigo da luz, para evitar sua volatilização.

3.5.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial

A caracterização dos componentes do óleo essencial das folhas de *Myrcia hatschbachii* foi realizada no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais do departamento de química da UFPR.

A análise foi feita em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas Shidmazu® CG-EM QP2010 Plus, equipado com coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injetor em modo Split a 250°C, interfase e fonte de íons a 250°C. A janela de massas foi ajustada para as análises na faixa entre 40-350 m/z, utilizando Hélio como gás de arrastre, com fluxo na coluna de 1,02 mL/minuto. Rampa de injeção para análise com temperatura do injetor em 250°C, pressão da coluna de 59 KPa, iniciando-se com temperatura de 60°C elevando-se para 250°C a uma razão de 3°C/min.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada através da comparação dos índices de retenção de Kovats obtidos nos espectros, com os documentados na literatura (ADAMS, 2007).

3.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA: OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

3.6.1 Preparo do Extrato bruto

O extrato bruto (EB) foi obtido através do aparelho Soxhlet modificado por Carvalho (2009), e possui patente de modelo industrial no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o nº 0601703-7 A2.

A planta triturada foi pesada, aproximadamente 600 g para galhos e 500 g para folhas, e colocada no aparelho Soxhlet, o qual continha uma placa porosa e algodão para conter o material vegetal. Este aparelho foi acoplado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato contendo pérolas de vidro. O solvente utilizado para a extração foi o etanol 96°GL, em um volume de 2,2 à 3,5 litros. Esse sistema sofreu aquecimento, quando colocado sob uma manta. Então, foi deixado em refluxo, por aproximadamente 4 períodos de 4 horas para galhos e 10 à 11 períodos de 4

horas para folhas, para a obtenção do extrato hidroalcoólico, que foi recolhido no balão de fundo chato, por extração do meio solvatado.

Através do aquecimento, o solvente é evaporado e o condensador de bolas faz com que esse solvente volte e percorra novamente o material vegetal. O aparelho de Soxhlet é economicamente viável, visto que o solvente é reutilizado em toda a extração (CARVALHO et al., 2009).

Este processo foi realizado separadamente para folhas e galhos, obtendo-se assim o extrato bruto de folhas e o extrato bruto de galhos. Partindo-se destes extratos brutos, foram realizadas as análises de teor de sólidos, fracionamento e atividades biológicas.

3.6.1.1 Teor de sólidos

O teor de sólidos se baseia na eliminação da fase líquida do extrato bruto. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Em 3 placas de Petri (triplicata), previamente dessecadas e taradas, foram adicionados 10 mL de extrato bruto hidroalcoólico (folhas ou galhos). As placas foram levadas a estufa a 100°C por 2 horas e posteriormente pesadas, após resfriamento no dessecador, até a observação de peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo sólido do extrato e a placa vazia fornece o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

O teor de sólidos também permite o cálculo do rendimento dos extratos brutos conforme a fórmula (4):

$$(4)\quad \text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Volume EB} \times \text{Teor de sólidos \%}}{\text{Planta seca}} \times 100$$

Onde:
Volume EB = Volume de extrato bruto obtido em mL.
Planta seca = Quantidade de planta seca e triturada em g utilizada para a obtenção do extrato bruto.

3.6.1.2 Fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico

Os extratos brutos hidroalcoólicos de folhas e galhos foram concentrados em rotaevaporador até que se obteve aspecto de extrato fluido e a partir deste, a obtenção de frações foi realizada pelo sistema de partição líquido-líquido. Foram utilizados solventes que apresentam padrão analítico e polaridades diferentes, na seguinte ordem crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila.

O fracionamento dos extratos brutos em escala de polaridade é realizado para auxiliar na identificação das classes de metabólitos com atividades nos bioensaios.

Para o fracionamento, foi utilizado o aparelho de Soxhlet modificado (PI 0601703-7 A2). O aparelho contendo o extrato bruto concentrado foi conectado ao condensador de bolas e ao balão de fundo chato contendo pérolas de vidro. Após ser adicionado o primeiro solvente, hexano, este sistema foi então levado a refluxo, para que os solventes pudessem realizar uma adequada extração. Este processo foi repetido com os demais solventes. O extrato restante foi denominado de fração remanescente.

Assim, foram obtidas oito frações (quatro de folhas e quatro de galhos: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e remanescente), correspondendo a quatro polaridades. Estas frações foram avaliadas nos bioensaios e demais testes juntamente com os próprios extratos brutos, totalizando dez amostras analisadas.

O rendimento de cada fração foi calculado conforme a fórmula (5):

$$(5)\ \text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa da fração obtida em g}}{\text{Planta seca em g}} \times 100$$

Onde:
Planta seca = Quantidade de planta seca e triturada utilizada no fracionamento.

3.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA: ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO

A partir das frações obtidas no particionamento do extrato bruto, foi escolhida a fração folha acetato de etila para a purificação em coluna, a qual apontou os resultados mais promissores de atividade antioxidante, apresentados posteriormente.

Previamente, a fração foi analisada por cromatografia em camada delgada para a investigação da presença de compostos fenólicos (flavonoides, taninos e cumarinas, os quais são responsáveis pelas atividades antioxidantes).

Cerca de 3,6 g de fração folha acetato de etila foram solubilizadas em metanol e em seguida, houve a formação de uma pastilha a partir da incorporação da fração em sílica-gel 60. A cromatografia em coluna foi realizada com esta pastilha, por um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes, onde ocorre a eluição da amostra.

A fase móvel foi iniciada por Hexano: Acetato de etila (40:60), passando por Acetato de etila (100), Acetato de etila: Metanol (95:5), e finalizando em Acetato de etila: Metanol (60:40), sempre em ordem crescente de polaridade com aumento e diminuição da proporção das fases em 5%. Para cada um destes gradientes, foram recolhidos frascos de 10 mL contendo a amostra eluída.

As frações coletadas foram evaporadas e os frascos numerados de 2 a 10, correspondentes a eluição Hexano: Acetato de etila (35:65), apresentaram precipitação de cristais. Amostras destes cristais foram enviadas para identificação do constituinte químico, pelos métodos de Difratometria de raios X de monocristal, Ressonância Magnética Nuclear e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada

O ensaio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizado com os cristais obtidos em coluna aberta, e também com o extrato bruto e fração folha acetato de etila, os quais foram os materiais de partida para a obtenção destes cristais. Estas amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 mg/mL e aplicadas, com o auxílio de capilares, em cromatoplacas de sílica gel 60 UV254, da marca Whatman®, de dimensões 20 x 20 cm. Após a revelação, as placas foram observadas a olho nu e sob luz ultravioleta. O QUADRO 4 apresenta os solventes e proporções de fases móveis, assim como os reveladores utilizados nesta análise.

Como o cristal foi obtido a partir da fração folha acetato de etila, o ensaio de CCD foi direcionado para a pesquisa de compostos fenólicos, como flavonoides, taninos e cumarinas.

QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DE FASES MÓVEIS E REVELADORES DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

CONSTITUINTE QUÍMICO	FASE MÓVEL	REVELADOR	RESULTADO ESPERADO	METODOLOGIA
Flavonoides	Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético glacial: Água (100:11:11:26)	Reativo de NEU	Presença de banda amarela sob luz UV (254 nm)	WAGNER, 1996
Taninos		Cloreto férrico 1%	Presença de banda azul (taninos hidrolisáveis) e/ou verde escura (taninos condensados) a olho nu	
Cumarinas	Tolueno: Acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e Hidróxido de sódio 1N	Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254 nm)	MIGUEL, 2003

FONTE: O autor (2017).
NOTA: Reativo de NEU - Difenolboriloxietilamino a 1% em metanol.

3.7.2 Difratometria de raios X de monocristal

Os cristais isolados passaram por análise de difratometria de raios X de monocristal (DRXM) realizado pelo departamento de química da UFPR.

Os dados de difração foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de Mo-Kα (λ= 0,7107 Å) e Cu-Kα (λ= 1,5418 Å), e dispositivo Kryoflex II, para realização de coletas à baixa temperatura. A análise foi realizada a 200 K utilizando-se a fonte de Cu-Kα. Para a realização da análise foi selecionado um fragmento cristalino de uma porção de cristais imersos em óleo mineral, o qual foi transferido cuidadosamente para um *micro-mount* que foi fixado no goniômetro do difratômetro. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre) e estão de acordo com o seguinte número de depósito na base de dados: 1451205. O diagrama da estrutura foi construído com o auxílio do programa ORTEP-3 para Windows (FARRUGIA, 2012).

3.7.3 Ressonância Magnética Nuclear

A substância isolada também foi submetida a análises espectrométricas para determinação da estrutura, através de Ressonância Magnética Nuclear, realizada no Centro de RMN do departamento de química da UFPR.

Os espectros de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ e ^{1}H foram adquiridos a temperatura ambiente (~ 20 °C) em CD_3OD-*d*4 contendo 0,1% (v/v) de tetrametilsilano (TMS) em espectrômetro de RMN Bruker DPX 200, operado a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^{1}H e ^{13}C nas frequências de 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. O equipamento foi equipado com uma sonda quadrinuclear (^{1}H, ^{13}C, ^{19}F e ^{31}P) de observação direta de 5 mm.

O espectro de ^{1}H foi adquirido utilizando sequência de pulso *zg*, 16 scans, 32k pontos distribuídos em uma janela espectral de aproximadamente 9 ppm, providenciando uma resolução espectral de 0,11 Hz. Enquanto que, o espectro de $^{13}C\{^{1}H\}$ foi adquirido empregando sequência de pulso *zgpg30*, 10k scans, 32k pontos distribuídos em uma janela espectral de aproximadamente 240 ppm, resultando em uma resolução espectral de 0,73 Hz. Os deslocamentos químicos de ^{1}H e ^{13}C são expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do TMS, como referência interna, em 0,00 ppm.

3.7.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Amostras de cristal isolado (1 mg/mL), extrato bruto (20 mg/mL) e frações (5 mg/mL para acetato de etila e 10 mg/mL para clorofórmio e remanescente) das folhas de *Myrcia hatschbachii* foram diluídos em metanol e submetidos à análise por CLAE/DAD (Merck Hitachi® Elite Lachrom) para avaliação do perfil cromatográfico.

As condições de injeção foram: coluna analítica XTerra® RP18 (4,6 mm x 250 mm, partículas 5 µm) a 25°C, volume de injeção de 20 µL e fluxo 1,00 mL/minuto. O tempo de corrida foi de 45 minutos e a detecção foi realizada por varredura de espectro de 200 a 400 nm.

A eluição ocorreu em gradiente de concentração utilizando uma fase ácida (ácido fosfórico PA: ácido sulfúrico 0,1N: água miliQ, na proporção 2: 200: 800 mL) (Fase A) e Metanol (Fase B), conforme descrito no QUADRO 5.

QUADRO 5 – MÉTODO POR GRADIENTE EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD

TEMPO (minutos)	FASE A: FASE ÁCIDA	FASE B: METANOL	FLUXO DE INJEÇÃO
0,0	80%	20%	1,0 mL/minuto
3,0	80%	20%	1,0 mL/minuto
35,0	0	100%	1,0 mL/minuto
40,0	0	100%	1,0 mL/minuto
43,0	80%	20%	1,0 mL/minuto

FONTE: O autor (2017).

3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação de uma possível atividade antioxidante exercida pela espécie *Myrcia hatschbachii* foi testada pelo método de redução do radical DPPH• e formação do complexo fosfomolibdênio. O método de redução do radical DPPH• é rápido, simples e bastante utilizado. As plantas medicinais que apresentam atividade antioxidante, reduzem o radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), pela permuta de elétrons ou átomos de hidrogênio. Já o método de formação de complexo fosfomolibdênio permite avaliar a atividade de compostos lipofílicos e hidrofílicos.

3.8.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

A técnica de avaliação da atividade antioxidante com formação de complexo fosfomolibdênio é fundamentada na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V), pela amostra com capacidade antioxidante, e formação de um complexo fosfato-molibdênio (V), de coloração verde em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente (PRIETO et al., 1999).

Para a reação de formação do complexo foi necessário o preparo, no momento do uso, de um reativo que consiste de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,6 $mol.L^{-1}$, fosfato de sódio 28 $mmol.L^{-1}$ e molibdato de amônio 4 $mmol.L^{-1}$. Soluções padrões de Ácido ascórbico, Hidroxitolueno butilado (BHT) e Rutina, bem como as amostras a serem testadas (extratos brutos e frações), foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003). O óleo essencial também foi preparado na concentração de 200 µg/mL em metanol, com adição de Polisorbato 80 na proporção de 1:1 (m/m).

Em tubos de ensaio, para cada amostra, foi pipetado uma alíquota de 0,3 mL, e adicionado 3 mL de reativo. O mesmo foi realizado com os padrões. O branco foi

constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo para padrões e amostras de extrato bruto e frações, e 0,3 mL de Polisorbato 80 à 0,1% em metanol e 3 mL de reativo para o óleo essencial. A análise das amostras foi realizada em triplicata. Os tubos foram fechados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos.

Ao atingir a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorbâncias (Abs) em microplacas com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', através da leitura a 690 nm em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific®.

Os resultados são expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação ao Ácido ascórbico, BHT e Rutina (padrões considerados com atividade antioxidante 100%). A fórmula (6) demonstra o cálculo de atividade antioxidante frente a estes padrões:

$$(6)\quad AAR\% = \frac{[\text{Concentração Padrão mg/mL} \times (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})]}{[\text{Concentração Amostra mg/mL} \times (\text{Abs padrão} - \text{Abs branco})]} \times 100$$

A análise de variância foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre os resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6.

3.8.2 Redução do radical DPPH•

Este ensaio consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

O método realizado foi baseado no método descrito por Mensor et al. (2001). A solução metanólica de DPPH• foi preparada no momento do uso em concentração 0,3 mM. Também foram preparadas soluções mães de amostras e padrões (Rutina, BHT, Ácido ascórbico) na concentração de 1 mg/mL em metanol.

A partir destas, foram realizadas as diluições nas concentrações propostas, de forma que cada curva tivesse um mínimo de 5 pontos e contemplasse a concentração de IC_{50} (concentração necessária para exercer 50% da atividade

antioxidante ou, em outras palavras, reduzir 50% da concentração inicial de DPPH•). Assim, foram preparadas concentrações entre 3 µg/mL a 36 µg/mL para extratos brutos, frações clorofórmio, frações acetato de etila, frações remanescente e padrões e entre 40 µg/mL a 130 µg/mL para frações hexano, a fim de fornecer a faixa de melhor atividade.

A reação foi realizada em microplaca com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', a partir de 142 µL de cada solução diluída com adição de 58 µL de solução de DPPH•. Para cada amostra e padrão, foi preparado um branco, contendo 142 µL da solução de cada concentração e 58 µL de metanol. Um controle também foi preparado, contendo 142 µL de metanol e 58 µL de DPPH•.

Após 30 minutos de reação ao abrigo da luz e temperatura ambiente, foi feita a leitura das absorbâncias das amostras, realizadas em triplicata, em espectrofotômetro de luz ultravioleta Multiscan FC, Thermo Scientific®, com comprimento de onda a 540 nm.

A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi calculada a partir da fórmula (7):

$$(7)\quad AA\% = 100 - \frac{[(\text{Absorbância amostra} - \text{Absorbância branco}) \times 100]}{(\text{Absorbância controle})}$$

Para cada concentração de amostra e padrão testados foram calculados a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional.

Por regressão linear foi plotado um gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo y = ax + b, serviu de base para determinação do valor de IC_{50}.

A análise de variância foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre os resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6.

Para amostras de óleo essencial, foram preparadas soluções amostras e padrões na concentração de 200 µg/mL em metanol, com adição de Polisorbato 80 ao óleo na proporção de 1:1 (m/m). O controle foi constituído de Polisorbato 80 à 0,1% em metanol e reativo DPPH•. A reação e o cálculo seguiu-se conforme já descrito. O

resultado de porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial foi comparado aos resultados encontrados para os padrões na mesma concentração.

3.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.9.1 Atividade alelopática

3.9.1.1 Procedimento para extrato bruto e frações

O método de avaliação da atividade alelopática para extrato bruto e frações foi baseado no método descrito por Macias (2000); Chon (2005) e Dias (2005).

Caixas gerbox foram limpas com soluções de hipoclorito e álcool 70% e identificadas de modo que fossem localizados seus quadrantes. Para cada amostra e controles testados, foram utilizadas 2 gerbox: uma para a verificação da Germinação e outra para o Crescimento. Em cada caixa foram adicionados 2 papéis filtro Whatman n° 6, anteriormente autoclavados.

Foi preparada uma solução mãe para cada amostra e a partir desta, foram feitas diluições em metanol a fim de se obter as concentrações de 1000, 750, 500, 250 e 100 µg/mL. Como controles, foram utilizados água e metanol.

Em fluxo laminar, foram transferidos 6 mL de cada concentração para as caixas gerbox. Para o controle com metanol, foram transferidos 6 mL de solvente. As amostras e controle metanol foram deixados sob temperatura ambiente, por 24 horas, até total eliminação do solvente.

Após evaporação do solvente, novamente sob fluxo laminar, as amostras e controle metanol foram ressuspendidos, umedecendo os papéis filtro com 6 mL de água destilada. Nesta etapa, foi preparado também um controle com água, pipetando 6 mL do solvente.

As caixas gerbox foram divididas em 4 quadrantes, que representa a quadruplicata do teste, e em cada um destes quadrantes foram depositadas 5 sementes de alface (*Lactuca sativa* variedade *Grand rapids*), totalizando 20 sementes. Após a acomodação das sementes, as caixas foram incubadas em estufa BOD 20 ± 5°C, durante 7 dias.

A espécie *Lactuca sativa* é considerada um modelo universal para estudos envolvendo alelopatia, pois apresenta características importantes, como a

germinação rápida e uniforme, além da alta sensibilidade a uma variedade de compostos (SANTIAGO et al., 2017).

3.9.1.2 Procedimento para óleo essencial

O método de avaliação da atividade alelopática para óleo essencial foi baseado no método descrito por Silva et al. (2014).

Caixas gerbox foram limpas com soluções de hipoclorito e álcool 70% e identificadas de modo que fossem localizados seus quadrantes. Para cada amostra e controles testados, foram utilizadas 2 gerbox: uma para a verificação da Germinação e outra para o Crescimento. Em cada caixa foram adicionados 3 papéis filtro Whatman n° 6, anteriormente autoclavados, sendo um papel colado na tampa com auxílio de fita e dois papéis acomodados na base.

Foi preparada uma solução mãe, por meio da solubilização de Polisorbato 80 ao óleo essencial na proporção de 1:1 (m/m). A partir desta solução mãe, foram feitas diluições em água destilada a fim de se obter as concentrações de 1, 0,1, 0,01 e 0,001%. Como controles, foram utilizados água e Polisorbato 80 à 1% em água sob as mesmas condições das amostras.

Em fluxo laminar, foram transferidos 5 mL de água destilada nos papéis filtro acomodados na base das caixas gerbox. As caixas foram divididas em 4 quadrantes, que representa a quadruplicata do teste, e em cada um destes quadrantes foram depositadas 5 sementes de alface (*Lactuca sativa* variedade *Grand rapids*), totalizando 20 sementes.

Após a adição das sementes, foram transferidos 3 mL de cada concentração de solução amostra no papel filtro colado à tampa da caixa. Para os controles água e Polisorbato 80 à 1% em água foram pipetados 3 mL do respectivo solvente no papel filtro colado à tampa da caixa.

As caixas gerbox foram fechadas, envolvidas em papel filme PVC e incubadas em estufa BOD 20 ± 5°C, durante 7 dias.

3.9.1.3 Germinação

Na avaliação da germinação, foram realizadas leituras diárias, sempre no mesmo horário, abrindo-se as placas em fluxo laminar, durante 7 dias, com retirada

das sementes germinadas. As sementes são consideradas germinadas com o aparecimento da protusão da radícula através do tegumento (FEO et al., 2002; ADEGAS et al., 2003).

Para a verificação das diferenças das médias estatisticamente significativas empregou-se o teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar versão 5.6. Foram calculados também os Índices de Velocidade de Germinação (IVG) (MAGUIRE, J. D.; 1962), conforme fórmula (8), os quais foram submetidos aos mesmos testes estatísticos.

$$(8)\quad IVG = \frac{n° \text{ germ}^*}{1^{**}} + \frac{n° \text{ germ}}{2} + \frac{n° \text{ germ}}{3} + \frac{n° \text{ germ}}{4} + \frac{n° \text{ germ}}{5} + \frac{n° \text{ germ}}{6} + \frac{n° \text{ germ}}{7}$$

*Número de sementes germinadas

**Dia de leitura e retirada das sementes germinadas

3.9.1.4 Crescimento

A verificação do crescimento foi realizada no último dia do teste, por meio da leitura do crescimento do hipocótilo e da radícula com auxílio de uma régua. Para a verificação das diferenças das médias estatisticamente significativas empregou-se o teste de Scott-Knott ($p<0,05$), utilizando o software Sisvar versão 5.6.

3.9.2 Toxicidade preliminar *in vitro*

A avaliação da toxicidade preliminar *in vitro* dos extratos brutos, frações e óleo essencial foi realizada frente ao microcrustáceo *Artemia salina.* O método executado foi baseado no método descrito por Meyer (1982) e é considerado com custo baixo e de rápida execução.

Para a eclosão dos ovos, foi preparada uma solução salina (água do mar artificial) a partir da dissolução de 14,31 g de sal marinho (Instant Ocean Sea Salt) em 400 mL de água destilada. Esta solução foi aerada por 30 minutos e, durante a incubação, seu pH foi mantido entre 8,0 e 10,0 para evitar a morte dos crustáceos que são sensíveis ao pH abaixo de 6 ou acima de 10,5 (LEWAN et al.,1992).

Ovos de microcrustáceo da espécie *Artemia salina*, 200 mg, foram colocados para eclodir em 400 mL de solução salina. A temperatura foi controlada entre 27°C e 30°C e a solução foi mantida sob agitação e iluminação (20 W) constantes por 48 horas.

Foram preparadas soluções com os extratos brutos e frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólica) em concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100, 50 e 10 µL/mL em metanol, todos em quintuplicata. As mesmas concentrações foram preparadas para o controle positivo Sulfato de quinidina e óleo essencial, sendo que as amostras de óleo foram solubilizadas em Polisorbato 80 na proporção de 1:1 (m/m).

Os frascos contendo as soluções amostras e controles foram colocados em estufa a 40°C para total eliminação do solvente de diluição, inclusive o frasco controle negativo, contendo apenas o solvente da diluição (metanol e Polisorbato 80 à 0,1% em metanol para o óleo essencial).

Após evaporação, os frascos, contendo as amostras e controles, foram ressuspendidos com 1 mL de solução salina e a incubação de 10 náuplios foi realizada na sequência. O volume dos frascos foi completado com solução salina para 5 mL e após 24 horas, realizou-se a contagem dos náuplios vivos e mortos em presença das concentrações analisadas, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa.

Procedeu-se a avaliação dos resultados a partir da aplicação de testes estatísticos pelo método Probitos (FINNEY, 1956) através do software SPSS versão 23.0. Nestes testes, foram determinados as doses letais capazes de matar 50% e 90% dos naúplios, CL_{50} e CL_{90} respectivamente, bem como o intervalo de confiança de 95%. As amostras são consideradas tóxicas quando CL_{50} for menor que 1000 µg/mL (MEYER et al., 1982).

3.9.3 Atividade hemolítica *in vitro*

O método da atividade hemolítica *in vitro* foi baseado no método descrito por Banerjee et al. (2008). Anteriormente a realização do teste, foram preparados PBS (solução tampão fosfato-salino), sangue, soluções amostras e controles.

A solução tampão PBS foi obtida a partir de Cloreto de sódio (8,0 g/L), Cloreto de potássio (0,2 g/L), Fosfato dissódico (1,15 g/L), Fosfato monopotássico (0,2 g/L) e Água (q.s.p. 1000 mL). Após o preparo, o pH foi ajustado para 7,4 e a solução foi armazenada em geladeira, pois ao longo do teste, ela deve ser utilizada gelada.

No momento dos ensaios, o frasco de sangue de carneiro foi homogeneizado realizando leve agitação manual e foram transferidos 3 mL a um tubo de falcon para centrifugação durante 5 minutos a 3000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado lavado com cerca de 5 mL de PBS gelado. O processo se repetiu até a obtenção de sobrenadante incolor. Em seguida, a papa de hemácias foi diluída com PBS para obtenção de uma diluição a 2% (v/v). O sangue de carneiro desfibrinado foi adquirido da empresa Newprov®.

As amostras de extrato bruto e frações foram obtidas a partir do preparo de uma solução mãe a 1000 µg/mL, solubilizando-as em metanol 10% em PBS. A solução mãe de óleo essencial seguiu o mesmo preparo, com a adição de 50 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A partir das soluções mãe, foram realizadas diluições em PBS até a obtenção das concentrações 250, 500, 750 e 1000 µg/mL. Como controles positivos foram utilizados Triton 1% em PBS e Água potável, como controle negativo foi utilizado PBS e como padrão fitoquímico foram preparadas soluções e diluições de Saponina nas mesmas concentrações das amostras.

O teste de hemólise foi realizado em eppendorfs e em quadruplicata, e as reações procederam conforme o QUADRO 6.

QUADRO 6 – REAÇÃO REALIZADA NO TESTE DE HEMÓLISE

AMOSTRAS / BRANCOS / CONTROLES	REAÇÃO
Soluções Amostra: diluições Extrato bruto, Frações, Óleo essencial	200 µL de Amostra + 200 µL de Hemácia 2%
Padrão fitoquímico: diluições Saponina	200 µL de Saponina + 200 µL de Hemácia 2%
Controle positivo: Triton 1% em PBS	200 µL de Triton 1% + 200 µL de Hemácia 2%
Controle positivo: Água potável	200 µL de Água potável + 200 µL de Hemácia 2%
Branco - Cor: Controles positivos, Soluções amostra, Padrão Fitoquímico	200 µL de Controle positivo / Amostra / Padrão Fitoquímico + 200 µL de PBS
Branco – Solvente PBS: Triton 1%, Extrato bruto, Frações, Saponina.	200 µL de PBS + 200 µL de Hemácia 2%
Branco – Solvente DMSO 0,5% em PBS: Óleo essencial	200 µL de DMSO 0,5% em PBS + 200 µL de Hemácia 2%

FONTE: O autor (2017).

Após as pipetagens, os tubos de eppendorfs foram incubados em estufa a temperatura de 37°C durante 3 horas. Decorrido este tempo, foram levados para

centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido, 160 µL, para microplaca com fundo redondo de 96 poços em formato de 'U', para posterior leitura em espectrofotômetro Multiscan FC, Thermo Scientific® na faixa de 540nm.

A porcentagem da atividade hemolítica (AH%) foi calculada, em relação ao Triton 1% e em relação à Água potável, a partir das fórmulas (9 e 10):

$$(9)\quad AH\ \%\ (Triton) = \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco\ cor - Abs\ branco\ solvente)}{(Abs\ triton - Abs\ branco\ cor - Abs\ branco\ solvente)} \times 100$$

$$(10)\quad AH\ \%\ (Água) = \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco\ cor - Abs\ branco\ solvente)}{(Abs\ água - Abs\ branco\ cor)} \times 100$$

Na realização do cálculo, são subtraídas das absorbâncias do teste: as absorbâncias correspondentes ao branco cor, para descontar a influência da cor dos extratos brutos, frações e óleo essencial; e as absorbâncias do branco solvente, para descontar a influência dos solventes de preparo das soluções.

A análise de variância foi avaliada pelo teste ANOVA e a diferença estatística entre os resultados obtidos pelo teste de Tukey, sendo que valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Para estes estudos, utilizou-se o software Sisvar versão 5.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente ao início dos estudos, foi realizado um levantamento bibliográfico, a partir de artigos científicos, para a confirmação de que a pesquisa fitoquímica e biológica com a espécie é inédita nos testes e ensaios realizados neste trabalho.

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas e galhos da espécie *Myrcia hatschbachii* foram coletados, secos a sombra e temperatura ambiente por um mês e, posteriormente, triturados separadamente. A retirada de água da planta fresca é importante para manter uma maior estabilidade e evitar um meio reacional propiciado por reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiológica (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

As quantidades de droga vegetal seca e triturada foram de 1744,9 g para folhas e 2430,1 g para galhos, os quais foram utilizados para análises físico-químicas (umidade e cinzas totais), ensaio sistemático em análise fitoquímica, obtenção de extrato bruto e óleo essencial, sendo este último realizado apenas para as folhas.

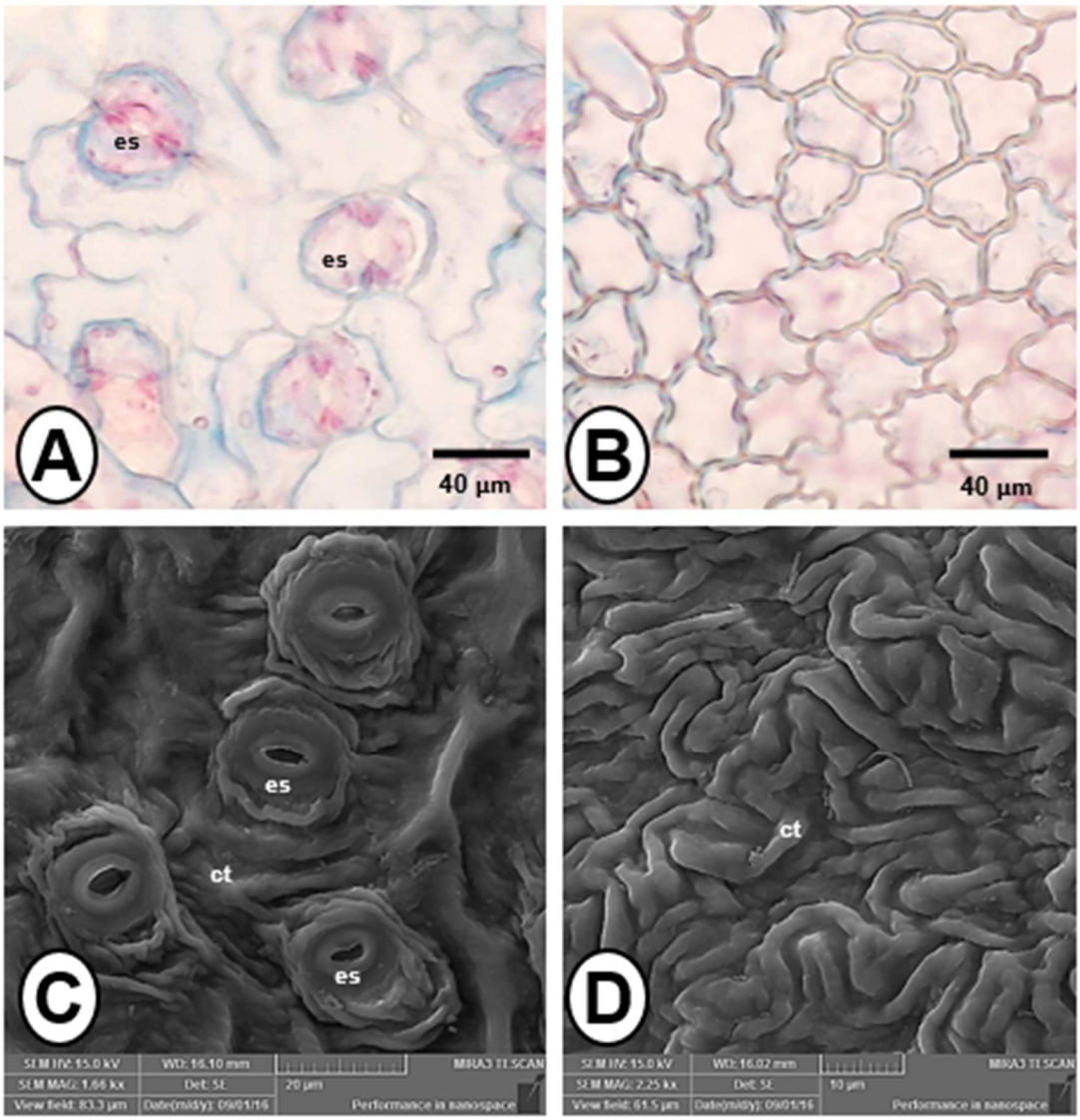
4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As folhas de *Myrcia hatschbachii* medem em média 9 cm de comprimento e 2,5 de largura, são lanceoladas, ápice agudo, margem inteira e base atenuada.

Em vista frontal, a espécie evidenciou paredes anticlinais das células epidérmicas delgadas e sinuosas na face abaxial (FIGURA 7A e 7C) e delgadas e ondeadas na face adaxial (FIGURA 7B e 7D). Por outro lado, as células epidérmicas de *Myrcia multiflora* apresentam paredes retas e contornos poligonais (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000).

A folha é caracterizada como hipoestomática sendo os estômatos do tipo paracítico (FIGURA 7A). A folha hipoestomática e o estômato paracítico são comumente encontrados no gênero *Myrcia* (RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2015).

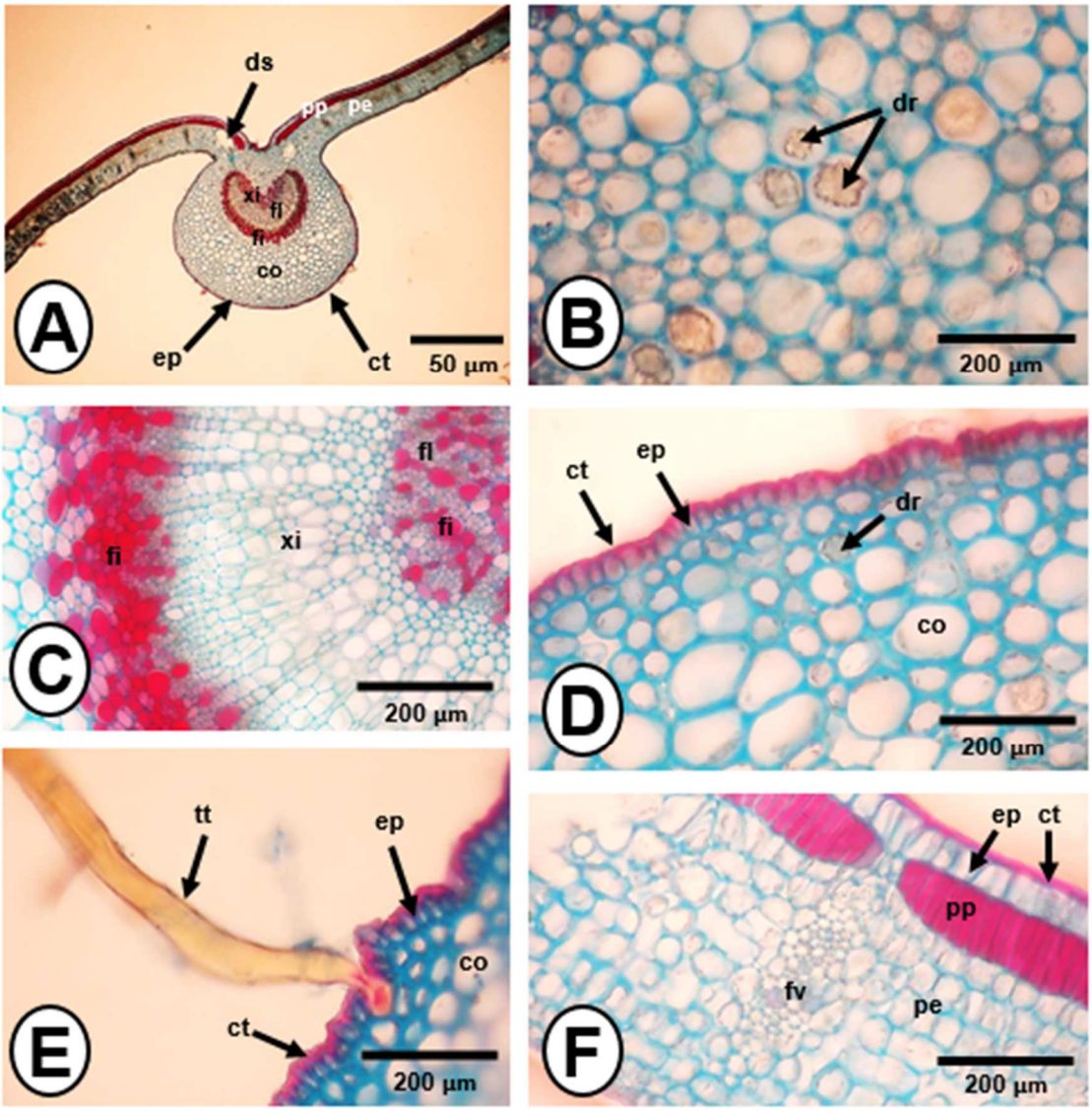
FIGURA 7 - VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPÉCIE *Myrcia hatschbachii*



FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: **A.** Face abaxial. **B.** Face adaxial. **C, D.** Face abaxial e face adaxial em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
NOTA 2: ct- cutícula; es- estômato.

Em secção transversal, a epiderme de *Myrcia hatschbachii* mostra-se uniestratificada com células isodiamétricas mais alongadas no sentido periclinal (FIGURA 8A, 8D e 8E). A cutícula é estriada em ambas as faces e reage positivamente ao Sudam III (FIGURA 8D, 8E e 9A). Na família Myrtaceae, as células epidérmicas de *Eugenia* são recobertas exclusivamente por cutícula estriada, já no gênero *Myrcia* as espécies podem apresentar folhas recobertas por cutícula lisa e estriada (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000). Subjacente à epiderme, encontra-se um colênquima angular onde é notada a presença de drusas de oxalato de cálcio (FIGURA 8D).

FIGURA 8 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DE *Myrcia hatschbachii*



FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: **A.** Visão geral da secção transversal. **B.** Drusas no parênquima de preenchimento. **C.** Detalhes do feixe vascular. **D.** Detalhes do colênquima. **E.** Tricoma tector unicelular. **F.** Detalhes do mesofilo.
NOTA 2: co- colênquima; ct- cutícula; dr- drusa; ds- duto secretor; ep- epiderme; fi- fibras; fl- floema; fv- feixe vascular; pe- parênquima esponjoso; pp- parênquima paliçádico; tt- tricoma tector; xi- xilema.

Na espécie *Myrcia hatschbachii*, foi observada a presença de tricomas tectores unicelulares (FIGURA 8E e 9A). Esta informação vai ao encontro do descrito por Briggs; Johnson (1979) e Metcalfe; Chalk (1979), os quais afirmam que este tipo de tricoma são os mais encontrados em Myrtaceae. Eles podem ocorrer em alguns gêneros como *Myrceugenia*, *Calyptranthes*, *Eugenia*, *Marlierea* e algumas espécies de *Myrcia*, constituindo um importante caráter para a diferenciação das espécies do Brasil (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

A presença de tricomas glandulares ou secretores não é tão descrita para espécies de Myrtaceae da América do Sul (RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2015).

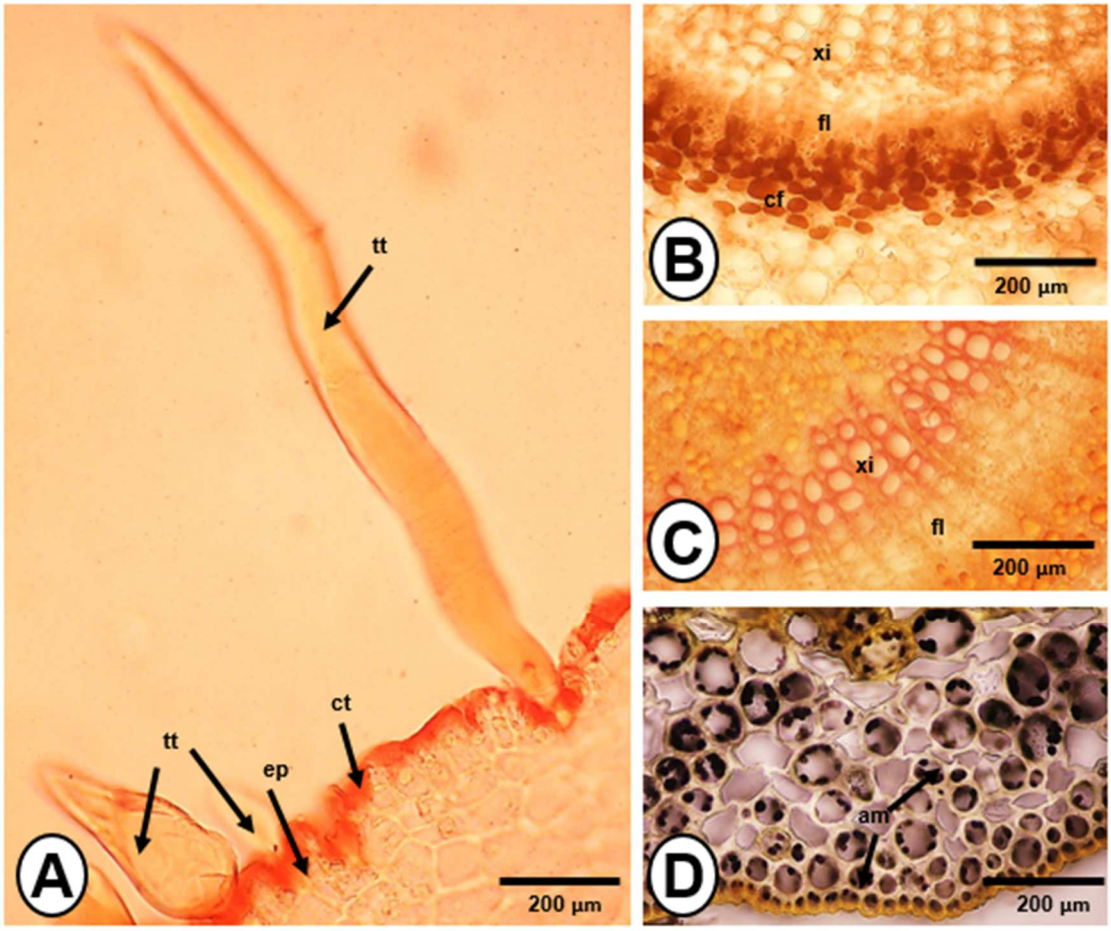
Algumas espécies da família são caracterizadas como glabras, entre elas *Campomanesia adamantium*, *Myrcia variabilis* (ARANTES; MONTEIRO, 2002) e *Eugenia punicifolia* (BRAZ et al. 2004), mas apresentam indumento nas gemas e o perdem com o desenvolvimento da folha.

O mesofilo é dorsiventral, formado por uma camada de parênquima paliçádico (FIGURA 8F) assim como ocorre em *Myrcia coriacea* (SUGDEN, 1985), *Myrcia guianensis* (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000), *Myrcia racemosa* (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003) e *Myrcia rostrata* (SILVEIRA, 2007). O parênquima esponjoso apresentou cerca de 6-8 camadas, em concordância com muitas espécies de *Myrcia*, exceto em *Myrcia decrescens*, onde varia de 3-5 camadas (GOMES et al., 2009).

A nervura central apresenta formato côncavo-convexo com evidente depressão na face adaxial (FIGURA 8A). Em *Myrcia multiflora* também foi evidenciado o formato côncavo-convexo, no entanto com ausência de depressão em suas faces (DONATO; MORRETES, 2011). A nervura central é biconvexa em *Myrcia decrescens* e plano-convexa em *Myrcia cordiifolia* e *Myrcia torta* (GOMES et al., 2009). Conforme amplamente descrito em literatura (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; AKINNUBI et al., 2013; BOBEK, 2015; WOSCH et al., 2015) a forma da nervura central, em secção transversal, constitui uma valiosa característica de identificação de drogas vegetais.

O sistema vascular é bicolateral, único, em arco aberto e está circundado por bainha esclerenquimática que reage positivamente à floroglucina clorídrica (FIGURA 9C). Destaca-se uma grande quantidade de substâncias com natureza fenólica (FIGURA 9B).

FIGURA 9 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA: TESTES HISTOQUÍMICOS



FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: **A.** Epiderme em reação com Sudam III. **B.** Reação com cloreto férrico. **C.** Reação com floroglucina clorídrica. **D.** Reação com lugol.
NOTA 2: am- amido; cf- compostos fenólicos; ct- cutícula; dr- drusa de oxalato de cálcio; ep- epiderme; fi- fibras; fl- floema; tt- tricoma tector;- xi: xilema.

Espécies de Myrtaceae podem apresentar feixe vascular geralmente único, em formato de arco quase plano ou semifechado. Feixes vasculares bicolaterais nas nervuras medianas foram encontrados nas espécies estudadas por Gomes et al. (2009). Em *Myrcia multiflora*, o xilema e o floema encontrados na nervura mediana formam um único feixe vascular em forma de arco com a abertura voltada para a face adaxial (DONATO; MORRETES, 2011).

Cavidades oleíferas esquizógenas, idioblastos contendo compostos fenólicos (FIGURA 9B) e idioblastos cristalíferos contendo drusas de oxalato de cálcio (FIGURA 8B e 8D) estão presentes no parênquima fundamental da nervura central. Nas espécies estudadas por Gomes et al. (2009), as cavidades secretoras distribuem-se ao longo de toda a extensão da lâmina foliar, indistintamente adjacentes às faces

abaxial e adaxial. Em *Myrcia multiflora* encontram-se cavidades secretoras de contorno arredondado, em ambas as faces, observando-se, entretanto, uma predominância dessas estruturas na região adaxial (DONATO; MORRETES, 2011).

O papel dos compostos produzidos por cavidades secretoras (principalmente sesquiterpenos e flavonoides em Myrtaceae) tem sido associado a uma série de funções de planta. Estas funções estão relacionadas a respostas diretas de defesa e metabolismo de diversos produtos químicos (BANTHORPE et al., 1972). As cavidades secretoras são uma das características mais distintivas de Myrtaceae (WILSON, 2011).

Segundo Metcalfe e Chalk (1979), os cristais de oxalato de cálcio estão amplamente presentes em Myrtaceae e têm diferentes formas e estrutura. Entre os cristais mais comuns estão drusas, as quais são amplamente encontradas nas mirtáceas chilenas e também foram relatados em espécies de *Eugenia*, *Gomidesia*, *Psidium* e *Myrcia*, entre outros gêneros da América do Sul (CARDOSO et al., 2009; GOMES et al., 2009).

Conforme descrito por Donato; Morretes (2011), o tipo, a localização e a quantidade de cristais encontrados na lâmina foliar foram importantes para a diagnose de *Myrcia multiflora*, na qual foi notada a presença de grande quantidade de cristais prismáticos. Já em *Myrcia guianensis* é escassa a presença de cristais de oxalato de cálcio (JORGE et al., 2000), e ausente em *Myrcia coriacea* (SUGDEN, 1985).

Os testes histoquímicos revelaram uma grande quantidade de amido em muitas células da epiderme e parênquima fundamental (FIGURA 9D). Em *Myrcia multiflora*, a presença de grãos de amido foi evidenciada nas células parenquimáticas adjacentes às fibras, formando, em torno do sistema vascular, uma bainha amilífera. O amido também foi encontrado em menor quantidade nas demais células do parênquima cortical (DONATO; MORRETES, 2011).

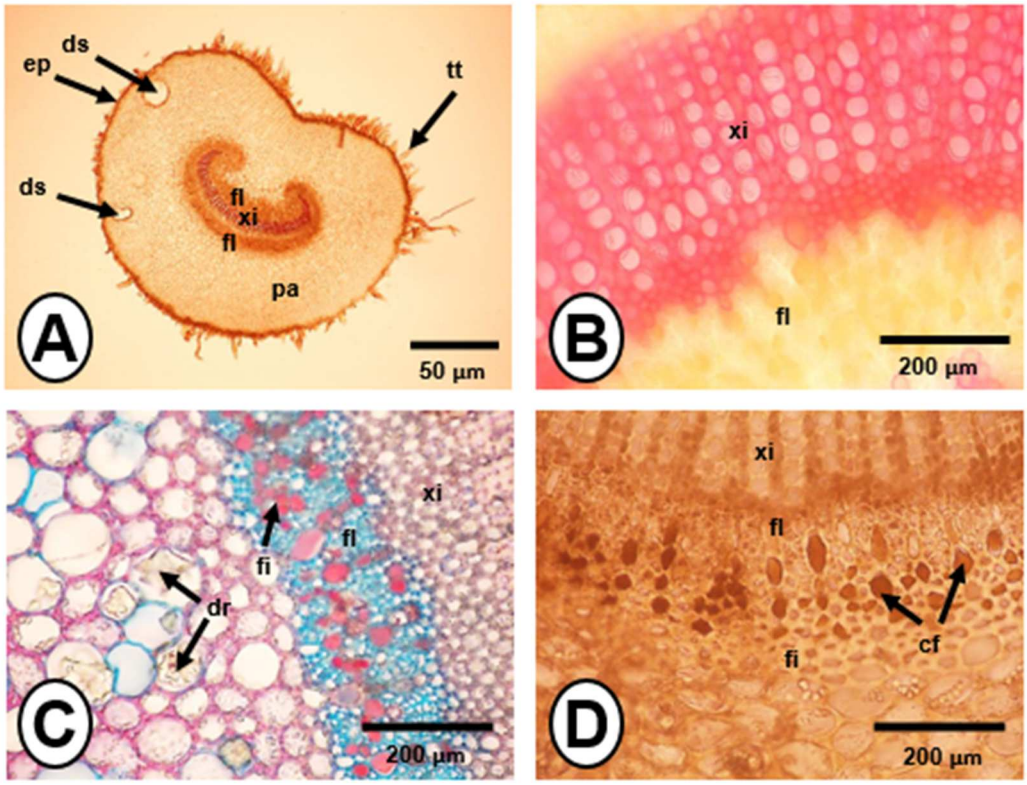
O pecíolo em secção transversal apresenta formato côncavo-convexo, e uma grande quantidade de tricomas tectores recobrem a epiderme uniestratificada (FIGURA 10A).

O sistema vascular está representado por um feixe vascular em arco aberto com as extremidades invaginadas (FIGURA 10A). No teste histoquímico, observa-se reação positiva do xilema com floroglucina clorídrica (10B).

As características do pecíolo assemelham-se as descritas para a folha como por exemplo, nota-se a presença de cavidades secretoras (FIGURA 10A), drusas de

oxalato de cálcio por toda a extensão (FIGURA 10C) e substâncias com conteúdo fenólico na região vascular (FIGURA 10D).

FIGURA 10 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DE *Myrcia hatschbachii*

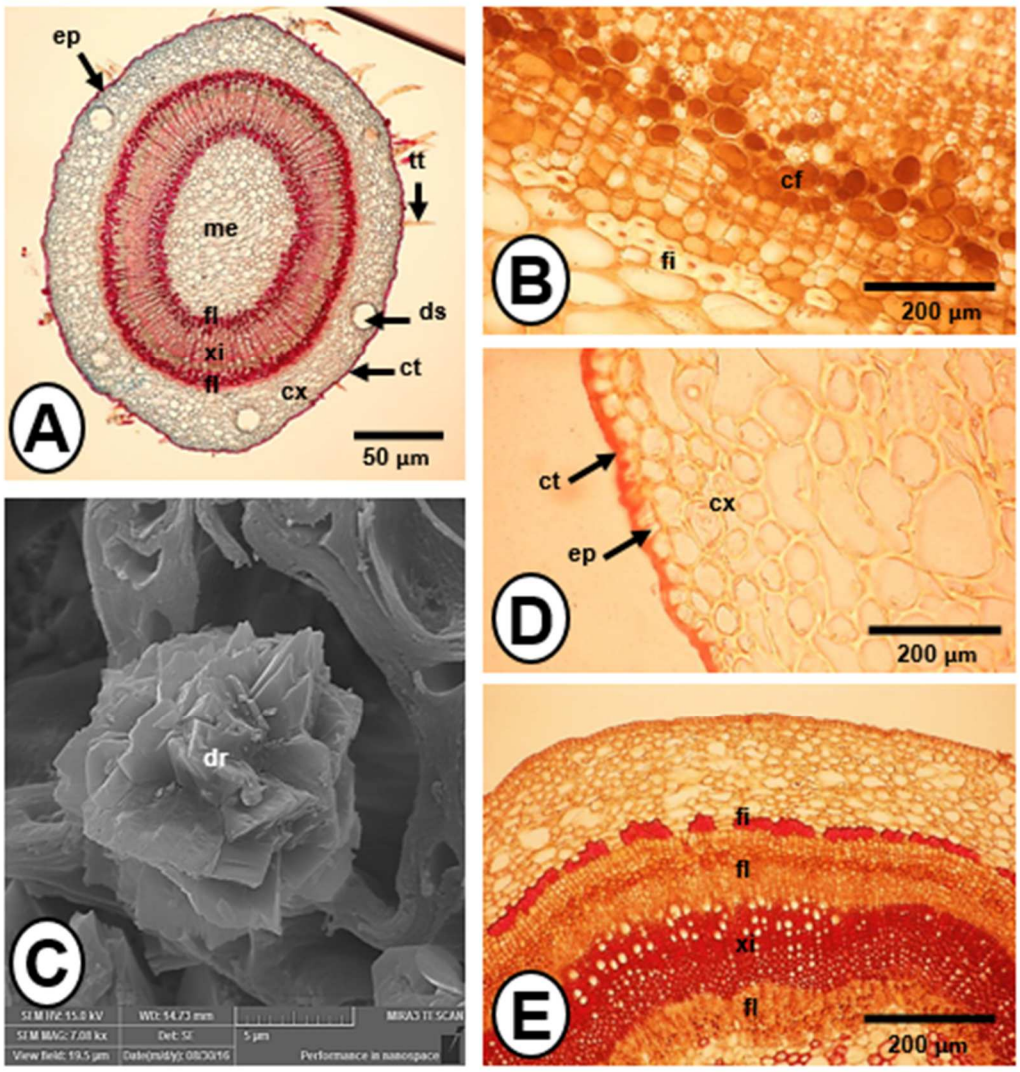


FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: **A.** Visão geral do pecíolo. **B.** Feixe vascular evidenciado com floroglucina clorídrica. **C.** Detalhes do feixe vascular. **D.** Detalhes do feixe vascular evidenciando compostos fenólicos.
NOTA 2: cf- compostos fenólicos; dr- drusa; ds- duto secretor; ep- epiderme; fi- fibras; fl- floema; pa- parênquima; tt- tricoma tector; xi- xilema.

São escassos os estudos morfoanatômicos de caules do gênero *Myrcia*. A espécie em questão evidenciou caule com formato ovalado, em secção transversal. A epiderme é uniestratificada e recoberta por cutícula estriada que reage positivamente ao Sudam III (FIGURA 11A, 11D). Tricomas tectores unicelulares encontram-se espalhados pela superfície (FIGURA 11A). Estes foram amplamente relatados para o gênero *Myrcia* (RETAMALES; SCHARASCHKIN, 2015). Cavidades secretoras estão presentes no córtex (FIGURA 11A). O sistema vascular é bicolateral e está envolvido por uma bainha esclerenquimática descontínua a qual reage positivamente ao teste com floroglucina clorídrica (FIGURA 11E). No floema externo e interno são observados inúmeros idioblastos fenólicos (FIGURA 11B). Na região medular são

observadas células lignificadas e numerosas drusas de oxalato de cálcio (FIGURA 11C).

FIGURA 11 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO CAULE DE *Myrcia hatschbachii*



FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: **A.** Visão geral do caule. **B.** Reação com dicromato de potássio. **C.** Drusa de oxalato de cálcio na região medular em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **D.** Reação da cutícula com Sudam III. **E.** Reação com floroglucina clorídrica.
NOTA 2: cf- compostos fenólicos; ct- cutícula; cx- córtex; dr- drusa; ds- duto secretor; ep- epiderme; fi- fibras; fl- floema; me-mesofilo; tt- tricoma tector; xi- xilema.

Dentre os marcadores morfoanatômicos que caracterizam a espécie, podemos destacar o formato côncavo-convexo da nervura central, a presença de estômatos paracíticos nas folhas e de drusas de oxalato de cálcio, compostos fenólicos e tricomas tectores nas folhas, pecíolos e galhos.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas são ensaios relevantes que auxiliam na identificação e controle de qualidade da espécie e identificação de impurezas, provenientes de adulterações do material botânico.

Na Farmacopeia Brasileira V não foram encontrados dados para estabelecer os limites máximos destas análises, portanto foi utilizada como parâmetro de comparação a única espécie da família Myrtaceae descrita, *Eugenia uniflora* L., na qual a determinação de cinzas totais não deve exceder 11,0% e a determinação de umidade não deve exceder a 10,0%.

4.3.1 Umidade (Perda por dessecação)

A determinação de umidade quantifica qualquer substância volátil eliminada da droga vegetal estudada, fornecendo um parâmetro de avaliação para o seu controle de qualidade e garantindo a estabilização e eficiência no processo de secagem. A TABELA 1 apresenta os resultados encontrados para a análise de umidade na espécie pesquisada.

TABELA 1 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

PARTE AÉREA	UMIDADE (%)	DESVIO PADRÃO	DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)
Galhos	11,20	0,0749	0,67
Folhas	11,43	0,1088	0,95

FONTE: O autor (2017).

4.3.2 Cinzas totais

De maneira geral, as plantas apresentam, intrinsicamente, compostos inorgânicos. A quantificação destes compostos é avaliada por meio da determinação do resíduo por incineração, onde a planta calcinada à alta temperatura, resulta em compostos minerais na forma de cinzas. Ao exceder os limites propostos, a análise pode detectar possibilidades de adulteração e contaminação presentes na droga vegetal. A TABELA 2 apresenta os resultados encontrados para a análise de cinzas totais na espécie pesquisada.

TABELA 2 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

PARTE AÉREA	CINZAS TOTAIS (%)	DESVIO PADRÃO	DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)
Galhos	3,87	0,1346	3,48
Folhas	8,53	0,0690	0,81

FONTE: O autor (2017).

4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

O método de screening fitoquímico objetiva o conhecimento e avaliação da presença de constituintes químicos dos vegetais, indicando o grupo de metabólitos secundários e substâncias majoritárias da espécie e auxiliando no direcionamento dos experimentos.

4.4.1 Extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico foi preparado separadamente para folhas e galhos, sendo que ambos apresentaram coloração marrom. Posteriormente, os extratos foram fracionados, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a fração remanescente hidroalcoólica. A pesquisa dos constituintes químicos foi realizada em todas as frações e os resultados estão apresentados na TABELA 3 para galhos e na TABELA 4 para folhas.

TABELA 3 - RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GALHOS

GRUPO FITOQUÍMICO	ANÁLISES	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLORO-FÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	FRAÇÃO REMANES-CENTE
Alcaloides	Reativo Mayer	-	-	-	-
	Reativo Dragendorff	-	+	-	-
	Reativo Bouchardat	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	Não aplicável	-	-	+	+
Heterosídeos flavônicos	Flavonoides	-	-	-	-
	Oxálico bórico	-	-	-	-
Cumarinas	Não aplicável	+	+	+	+
Compostos iridoides	Floroglucinol	-	-	-	-
	H_2SO_4	-	-	-	-
	H_2SO_4 e vanilina	-	-	+	-
Antraquinonas	Reação Borntrager	-	-	-	-
Esteroides/ triterpenos	Libermann Bouchard	+	+	-	-
	Keller Kelliani	+	+	+	+

FONTE: O autor (2017).
LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

Nos galhos da espécie *Myrcia hatschbachii*, foi observada reação positiva para o reativo de Dragendorff e formação de precipitado de coloração tijolo na fração clorofórmio para a pesquisa de alcaloides. Porém, algumas substâncias oxigenadas com alta densidade eletrônica (cumarinas, chalconas, maltol, acetogenina) podem mostrar resultado falso positivo na utilização deste reativo (MOREIRA, 1979; MIGUEL, 2003). Nos demais reativos testados, todas as frações apresentaram resultados negativos para alcaloides.

A presença de leucoantocianidinas mostrou-se positiva nas frações acetato de etila e remanescente hidroalcoólica através do efeito batocrômico com o desenvolvimento de coloração vermelha.

A presença de cumarinas foi evidenciada em todas as frações com o aparecimento de fluorescência azul e verde quando visualizadas no ultravioleta.

Para compostos iridoides, a reação com ácido sulfúrico e vanilina apresentou-se positiva com o aparecimento de coloração rosa cereja para a fração acetato de etila. Nas demais reações, a pesquisa de iridoides foi negativa para todas as frações.

A pesquisa de esteroides e/ou triterpenos foi realizada pela reação de Libermann Bouchard, em que os resultados apresentaram-se positivos para as frações hexano e clorofórmio, com o desenvolvimento de coloração verde, a qual indica função hidroxila na posição 3 e dupla ligação entre as posições 5 e 6 do anel aromático. Na reação positiva de Keller Kelliani, houve o desenvolvimento de coloração na zona de contato das amostras, em todas as frações.

A pesquisa de heterosídeos flavônicos e antraquinonas apresentou resultados negativos para as frações testadas.

TABELA 4 - RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS

GRUPO FITOQUÍMICO	ANÁLISES	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLORO-FÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	FRAÇÃO REMANES-CENTE
Alcaloides	Reativo Mayer	-	-	-	-
	Reativo Dragendorff	-	-	-	-
	Reativo Bouchardat	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	Não aplicável	-	-	+	+
Heterosídeos flavônicos	Flavonoides	-	-	-	-
	Oxálico bórico	-	-	-	-
Cumarinas	Não aplicável	-	+	+	+
Compostos iridoides	Floroglucinol	-	-	-	-
	H_2SO_4	-	-	-	-
	H_2SO_4 e vanilina	-	-	+	-
Antraquinonas	Reação Borntrager	-	-	-	-
Esteroides/ triterpenos	Libermann Bouchard	+	+	-	-
	Keller Kelliani	+	+	+	+

FONTE: O autor (2017).
LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

Nas frações acetato de etila e remanescente hidroalcoólica das folhas espécie *Myrcia hatschbachii*, foi observada a presença de leucoantocianidinas através do efeito batocrômico com o desenvolvimento de coloração vermelha.

A presença de cumarinas foi evidenciada nas frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente hidroalcoólica com o aparecimento de fluorescência azul e verde no ultravioleta.

Para compostos iridoides, a reação com ácido sulfúrico e vanilina apresentou-se positiva com o aparecimento de coloração rosa cereja para a fração acetato de etila. Nas demais reações, a pesquisa de iridoides foi negativa para todas as frações.

A pesquisa de esteroides e/ou triterpenos foi realizada pela reação de Libermann Bouchard, em que os resultados apresentaram-se positivos para as frações hexano e clorofórmio, com o desenvolvimento de coloração amarela, a qual indica possivelmente a presença de metila no Carbono de posição 14. Na reação positiva de Keller Kelliani, houve o desenvolvimento de coloração na zona de contato das amostras, em todas as frações.

A pesquisa de alcaloides, heterosídeos flavônicos e antraquinonas apresentou resultados negativos para as frações testadas.

Como pode ser observado, os metabólitos presentes estão de acordo com o relatado na literatura para o gênero e família, com predominância de compostos fenólicos e esteroides e/ou triterpenos.

4.4.2 Extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado separadamente para folhas e galhos, sendo que ambos apresentaram coloração marrom e pH 5,0. A pesquisa dos constituintes químicos foi realizada e os resultados estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 – RESULTADOS DO ESTUDO FITOQUÍMICO NO EXTRATO AQUOSO

GRUPO FITOQUÍMICO	EXTRATO AQUOSO GALHOS	EXTRATO AQUOSO FOLHAS
Heterosídeos antociânicos	-	-
Heterosídeos saponínicos	+	-
Heterosídeos cianogênicos	-	-
Taninos Reação Cloreto férrico	+	+
Taninos condensados	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	+
Ácidos voláteis	-	-
Ácidos fixos	+	+
Amino grupos	+	+

FONTE: O autor (2017).
LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

No extrato aquoso de galhos da espécie *Myrcia hatschbachii*, foi observada a formação de espuma, sendo indicativo da presença de heterosídeos saponínicos. Porém, este teste é considerado inconclusivo já que existem outras substâncias capazes de formar espuma.

A pesquisa de taninos, pela reação com o cloreto férrico, foi considerada positiva com o desenvolvimento de coloração azul para o extrato aquoso de galhos e folhas. Ambos os extratos também apresentaram taninos condensados com o desenvolvimento de coloração verde e taninos hidrolisáveis com o aparecimento de coloração azul na reação com formol clorídrico (Ensaio de Staniasny).

A presença de amino grupo com o desenvolvimento de coloração azul violáceo e a presença de ácidos fixos com o aparecimento de coloração na reação da amostra com reativo de Nessler, também foram observadas positivas para os dois extratos aquosos testados. Já a pesquisa de heterosídeos antociânicos, heterosídeos cianogênicos e ácidos voláteis mostrou resultados negativos para estes extratos.

4.5 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais possuem propriedades medicinais conhecidas, como atividades antibacteriana e antifúngica. Assim, estudos que comprovam a composição química do óleo essencial se fazem necessários, devido a ocorrência de diversificações químicas nas espécies, como alterações ambiental, genética e fisiológica. As propriedades farmacológicas podem variar devido as diferenças de composição do óleo essencial, ressaltando a importância de análises químicas em estudos farmacêuticos que visam a busca de novos medicamentos derivados de plantas medicinais (REZENDE et al., 2013).

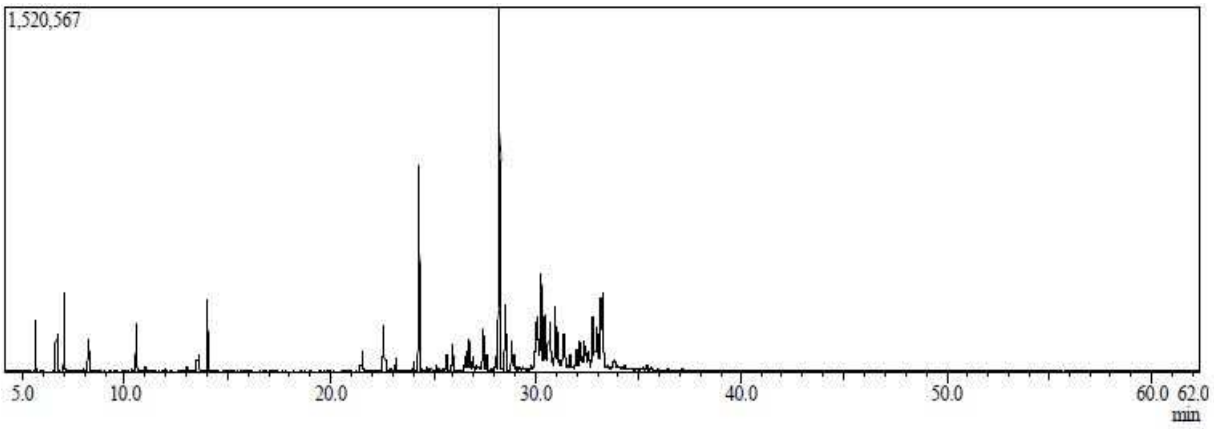
O óleo essencial das folhas de *Myrcia hatschbachii*, obtido por hidrodestilação por arraste de vapor d'água em aparelho de Clevenger, apresentou coloração amarelada e odor suave. A extração resultou na obtenção de 1,0 mL de óleo, correspondente a um rendimento de 0,17%. Assim, a cada 100 g de material vegetal seco das folhas é possível obter 0,17 mL de óleo essencial.

Em outros estudos, a extração de óleo essencial das folhas secas de *Myrcia sylvatica* apresentou rendimento de 0,5% (ROSA et al., 2016). Folhas frescas de *Myrcia obtecta*, *Myrcia oligantha*, *Myrcia pubipetala* e *Myrcia richardiana* obtiveram rendimento de 0,1%; *Myrcia arborescens* e *Myrcia rostrata* de 0,2%; *Myrcia lajeana* de 0,3% e *Myrcia selloi* de 0,5% (LIMBERGER et al., 2004). Os maiores rendimentos encontrados na literatura foram de 1,16% para folhas de *Myrcia multiflora* (PEREIRA et al., 2010) e 1,1% para folhas frescas de *Myrcia pubiflora* (ANDRADE et al., 2012).

4.5.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial

A caracterização dos componentes do óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, pelo departamento de química da UFPR. O cromatograma de análise resultante está representado na FIGURA 12.

FIGURA 12 - CROMATOGRAFIA GASOSA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii*



FONTE: O autor (2017).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas e Índices de Kovats obtidos com os espectros descritos por Adams (2007). A composição química do óleo essencial, bem como seus respectivos tempos de retenção, índices de retenção, classificação e porcentagens estão descritos na TABELA 6.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

TR	IRc	IRt	COMPOSTO IDENTIFICADO	CLASSIFICAÇÃO	[ ] %
5.600	928	932	α-Pineno	Monoterpeno	1,46
6.653	967	974	β-Pineno	Monoterpeno	1,18
7.017	980	988	Mirceno	Monoterpeno	2,48
8.180	1018	1025	β-Felandreno	Monoterpeno	1,18
8.227	1019	1024	Limoneno	Monoterpeno	0,90
10.533	1083	1095	Linalool	Monoterpeno oxigenado	1,91
13.543	1157	1174	Terpinen-4-ol	Monoterpeno oxigenado	0,76
14.000	1168	1186	α-Terpineol	Monoterpeno oxigenado	3,33
21.517	1342	1348	α-Cubebeno	Sesquiterpeno	1,01
22.613	1368	1373	α-Ylangeno	Sesquiterpeno	2,36
23.180	1381	1389	β-Elemeno	Sesquiterpeno	0,62
24.033	1400	1409	α-Gurjuneno	Sesquiterpeno	0,42
24.303	**1407**	**1417**	**(E)-Cariofileno**	**Sesquiterpeno**	**10,96**
25.667	1440	1452	α-Humuleno	Sesquiterpeno	0,87
25.967	1447	1458	Allo-aromadendreno	Sesquiterpeno	1,49
26.617	1462	1464	9-epi-(E)-Cariofileno	Sesquiterpeno	0,66
26.747	1466	1480	Germacreno D	Sesquiterpeno	1,52
26.963	1471	1489	β-Selineno	Sesquiterpeno	0,72
27.417	1482	1496	Viridifloreno	Sesquiterpeno	2,50
27.597	1486	1500	α-Muuroleno	Sesquiterpeno	0,76
28.240	**1502**	**1521**	**trans-Calameneno**	**Sesquiterpeno**	**19,10**
28.480	1508	1511	δ-Amorfeno	Sesquiterpeno	4,22
28.943	1519	1544	α-Calacoreno	Sesquiterpeno	0,60
30.260	**1552**	**1577**	**Espatulenol**	**Sesquiterpeno oxigenado**	**5,03**
30.453	1557	1582	Óxido de cariofileno	Sesquiterpeno oxigenado	2,54
30.653	1562	1590	Globulol	Sesquiterpeno oxigenado	2,38
30.927	1569	1600	Guaiol	Sesquiterpeno oxigenado	3,18
31.053	1572	1595	Cubeban-11-ol	Sesquiterpeno oxigenado	1,77
31.383	1580	1602	Ledol	Sesquiterpeno oxigenado	2,95
31.957	1595	1618	Junenol	Sesquiterpeno oxigenado	0,79
32.357	1605	1627	1-epi-Cubenol	Sesquiterpeno oxigenado	1,08
32.793	1616	1640	epi-α-Muurolol	Sesquiterpeno oxigenado	3,34
33.133	1625	1651	Pogostol	Sesquiterpeno oxigenado	3,40
33.230	1628	1644	α-Muurolol	Sesquiterpeno oxigenado	3,59
Total de compostos identificados					**91,06**

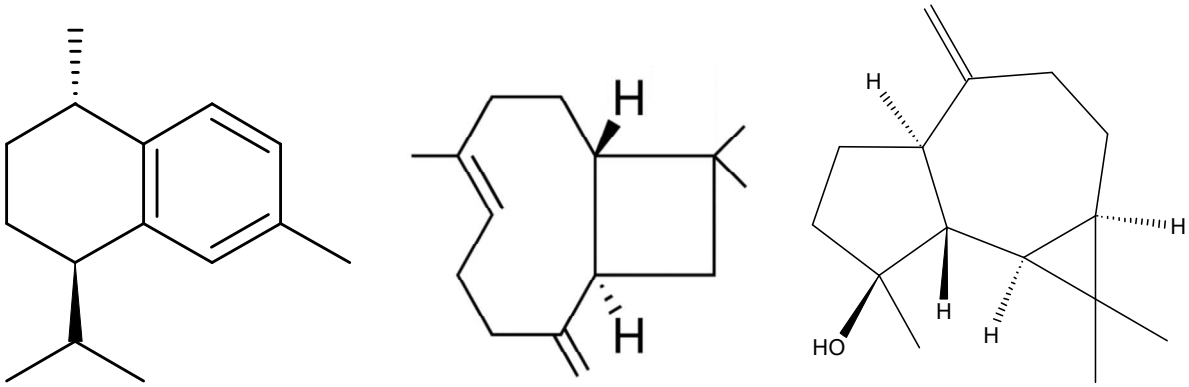
FONTE: O autor (2017).
NOTA: TR= tempo de retenção (minutos), IRt = índice de retenção teórico (Adams, 2007), IRc = índice de retenção calculado, %= porcentagem do componente.

Através da análise de CG/EM foram detectados 40 compostos, e dentre estes, 34 terpenos (mono e sesquiterpenos) foram identificados, correspondendo a 91,06%

dos componentes presentes no óleo essencial de *Myrcia hatschbachii*. Destes 34 compostos identificados, 5 (13,39%) eram monoterpenos, 3 (8,03%) eram monoterpenos oxigenados, 15 (40,17%) eram sesquiterpenos e 11 (29,46%) eram sesquiterpenos oxigenados. A predominância de sesquiterpenos está de acordo com os resultados obtidos para a maioria dos outros estudos das espécies de *Myrcia* (CERQUEIRA et al., 2009).

Os compostos majoritários encontrados foram os sesquiterpenos trans-Calameneno (19,10%), E-Cariofileno (10,96%) e o sesquiterpeno oxigenado Espatulenol (5,03%). A estrutura química destes compostos está apresentada na FIGURA 13.

FIGURA 13 – COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL *DE Myrcia hatschbachii*



trans-Calameneno E-Cariofileno Espatulenol

FONTE: O autor (2017).

O trans-Calameneno também foi o constituinte predominante de um estudo sazonal com óleo essencial de folhas frescas da espécie *Myrcia obtecta*, sendo que sua concentração foi a maior (17,0 a 29,3%) em todos os meses testados (STEFANELLO et al., 2010).

O composto E-Cariofileno foi o constituinte majoritário do óleo essencial das folhas secas de *Myrcia sylvatica* (45,9%) (ROSA et al., 2016); folhas e caules secos de *Myrcia cuprea* (39,2%) (ZOGHBI et al., 2003); folhas frescas de *Myrcia salzmannii* (variando de 9,3 a 41,5% em um estudo sazonal) (CERQUEIRA et al., 2009) e *Myrcia richardiana* (23,0%) (LIMBERGER et al., 2004).

Já o Espatulenol foi o constituinte predominante de óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia rostrata* (17,3%) e *Myrcia pubipetala* (31,5%) (LIMBERGER et al.,

2004), folhas e caules secos de *Myrcia bracteata* (31,0%) e *Myrcia sylvatica* (40,2%) (ZOGHBI et al., 2003).

Em relação as atividades biológicas das substâncias majoritárias, há relatos de que E-Cariofileno possui atividades espasmolítica, anestésica local e anti-inflamatória (LIMBERGER et al., 2004); assim como atividade antimicrobiana, podendo também atuar em defesa contra agentes patogênicos (LANG; BUCHBAUER, 2011; HUANG et al., 2012). No entanto, a atividade antibacteriana não deve ser atribuída apenas a um constituinte. Como os óleos essenciais são misturas complexas, o sinergismo e a influência antagonista de vários compostos devem ser considerados (SILVA et al., 2013).

O Espatulenol tem propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica contra células do tipo KB (LIMBERGER et al., 2004). Não foram encontradas propriedades biológicas relacionadas ao trans-Calameneno.

Um outro estudo de composição de óleo essencial de folhas frescas da espécie *Myrcia hatschbachii*, coletada entre os meses de novembro a janeiro, foi realizado e os compostos predominantes foram E-Cariofileno (23,3%); δ-Cadineno (8,1%) e Biciclogermacreno (6,9%) (LIMBERGER et al., 2004). Estes últimos dois compostos não foram identificados no presente estudo; assim como o trans-Calameneno (constituinte majoritário) não foi relatado por Limberger (2004). Isto se deve provavelmente as variações de coleta, como local e época do ano.

4.6 ANÁLISE FITOQUÍMICA: EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

4.6.1 Preparo do extrato bruto e determinação do teor de sólidos das partes aéreas

Os extratos brutos de folhas e de galhos de *Myrcia hatschbachii* foram realizados através do aparelho Soxhlet modificado, utilizando etanol 96°GL como solvente extrator.

A extração das folhas foi realizada em 2 etapas e a de galhos em 4 etapas, devido a quantidade de material vegetal triturado ser superior a capacidade do Soxhlet. Após todas as extrações serem realizadas, os extratos resultantes das folhas foram homogeneizados, assim como todos os dos galhos. Para o extrato bruto a partir das folhas, foram utilizados 985,1 g de folhas de planta triturada, obtendo 6,00 litros

de extrato, já para o extrato bruto a partir dos galhos, foram utilizados 2277,3 g de galhos de planta triturada, obtendo 7,48 litros de extrato. Ambos os extratos apresentaram coloração marrom.

A partir do extrato bruto, foi realizado a análise de teor de sólidos e os resultados estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE TEOR DE SÓLIDOS NOS EXTRATOS BRUTOS

PARTE AÉREA	TEOR DE SÓLIDOS (%)	DESVIO PADRÃO	DESVIO PADRÃO RELATIVO (%)
Galhos	0,820	0,0100	1,22
Folhas	2,100	0,0608	2,90

FONTE: O autor (2017).

O teor de sólidos permite calcular o rendimento do extrato hidroalcoólico, já que sua fase líquida é eliminada. Para o extrato a partir das folhas o rendimento encontrado foi de 12,79% e para o extrato a partir de galhos foi de 2,69%.

Após esta etapa, uma pequena parte de extrato bruto de folhas e galhos foi separada, e posteriormente evaporada, para a realização das atividades biológicas (resultando em cerca de 10 g de cada extrato bruto seco). A maioria restante dos extratos foi concentrada em rotaevaporador para dar sequência ao fracionamento.

4.6.2 Preparo das frações

A partição líquido-líquido das frações foi realizada separadamente para folhas e galhos de *Myrcia hatschbachii*, em aparelho Soxhlet modificado após obtenção dos extratos brutos. Os solventes utilizados para a obtenção das frações foram de polaridade crescente (hexano, clorofórmio e acetato de etila), até a obtenção da fração hidroalcoólica remanescente. Devido à grande quantidade de extrato bruto concentrado, o fracionamento foi realizado em 3 etapas para as frações: hexano e acetato de etila de galhos e hexano de folhas. As demais frações foram obtidas em uma única etapa.

Na TABELA 8 está representado a quantidade das frações evaporadas, em grama, e o rendimento em % em relação à quantidade de planta seca utilizada no

extrato bruto, a qual foi destinada para o fracionamento (2271,72g de galhos secos e 978,17g de folhas secas).

TABELA 8 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS POR SOXHLET

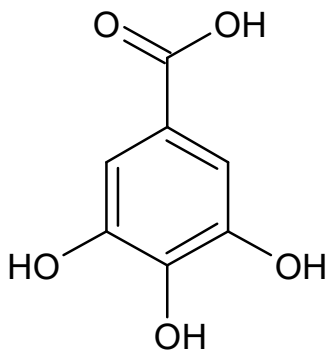
PARTE AÉREA	FRAÇÃO	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
Galhos	Hexano	19,1578	0,84
	Clorofórmio	18,1871	0,80
	Acetato de etila	8,8457	0,39
	Hidroalcoólica remanescente	23,8085	1,05
Folhas	Hexano	44,7293	4,57
	Clorofórmio	21,8222	2,23
	Acetato de etila	9,1208	0,93
	Hidroalcoólica remanescente	51,9705	5,31

FONTE: O autor (2017).

4.7 ANÁLISE FITOQUÍMICA: ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO

A investigação fitoquímica da fração folha acetato de etila resultou no isolamento de um polifenol, identificado como sendo o ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (conhecido comumente como ácido gálico) (FIGURA 14). A identificação foi realizada por meio de técnicas distintas, como Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Difratometria de raios X de monocristal, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

FIGURA 14 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO



FONTE: O autor (2017).

O isolamento do ácido gálico é inédito em *Myrcia hastchbachii*, mas sua presença já foi relatada em outras espécies do gênero, como no extrato metanólico de *Myrcia splendens* (GULDBRANDSEN et al., 2015), extrato hidroalcoólico de folhas

de *Myrcia bella* (SALDANHA et al., 2013) e fração acetato de etila de *Myrcia guianensis* (SOUZA et al., 2006).

A identificação deste composto corrobora com os estudos desenvolvidos e resultados obtidos no decorrer do trabalho, como a presença de taninos hidrolisáveis na marcha fitoquímica, a identificação de compostos fenólicos a partir da reação com dicromato de potássio nos testes histoquímicos, além da significativa atividade antioxidante da espécie, que será discutida posteriormente.

4.7.1 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e identificação de compostos naturais, sendo considerado um método simples, rápido, eficiente e de baixo custo.

Os resultados obtidos, mostrando os grupos de metabólitos encontrados na substância isolada e materiais foliares de partida (extrato bruto e fração acetato de etila), estão descritos na TABELA 9.

TABELA 9 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA A PESQUISA DE METABÓLITOS NO COMPOSTO ISOLADO

AMOSTRAS	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS		
	FLAVONOIDES	TANINOS	CUMARINAS
Extrato bruto folha	+	+	-
Fração folha acetato de etila	+	+	-
Composto isolado	-	+	-

FONTE: O autor (2017).
LEGENDA: (-) negativo; (+) positivo.

Como podemos observar, a pesquisa de flavonoides foi positiva para extrato bruto e fração acetato de etila, com a observação de uma banda amarela. Para cumarinas, a reação foi negativa em todas as amostras.

A pesquisa de taninos foi positiva para as três amostras, inclusive o cristal, com o aparecimento de uma banda azul escura correspondendo a taninos hidrolisáveis, sendo o ácido gálico um dos precursores deste metabólito. A banda presente no cristal, apresentou-se única, sendo característico de uma substância pura.

4.7.2 Difratometria de raios X de monocristal

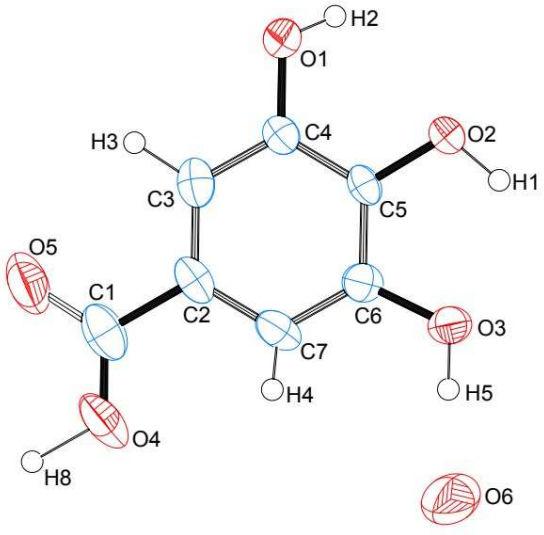
Após análise de Difratometria de raios X de monocristal, foi possível verificar que os parâmetros de célula unitária (TABELA 10) obtidos estavam de acordo com a estrutura do ácido gálico monohidratado, como mostra a FIGURA 15.

TABELA 10 - PARÂMETROS DE CÉLULA UNITÁRIA UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALINA

DADOS DO CRISTAL	EXPERIMENTAL
$C_7H_6O_5.H_2O$	
Grupo espacial	Monoclínico, $P2_1/n$
a/ Å	7,48
b/ Å	13,87
c/ Å	14,13
α/ °	90
β/ °	96,36
γ/ °	90
Volume/ Å3	934
Temperatura de análise	200 K

FONTE: O autor (2017).

FIGURA 15 – DIAGRAMA ORTEP DA ESTRUTURA DE $C_7H_6O_5.H_2O$ INDICANDO O ESQUEMA DE NUMERAÇÃO DOS ÁTOMOS



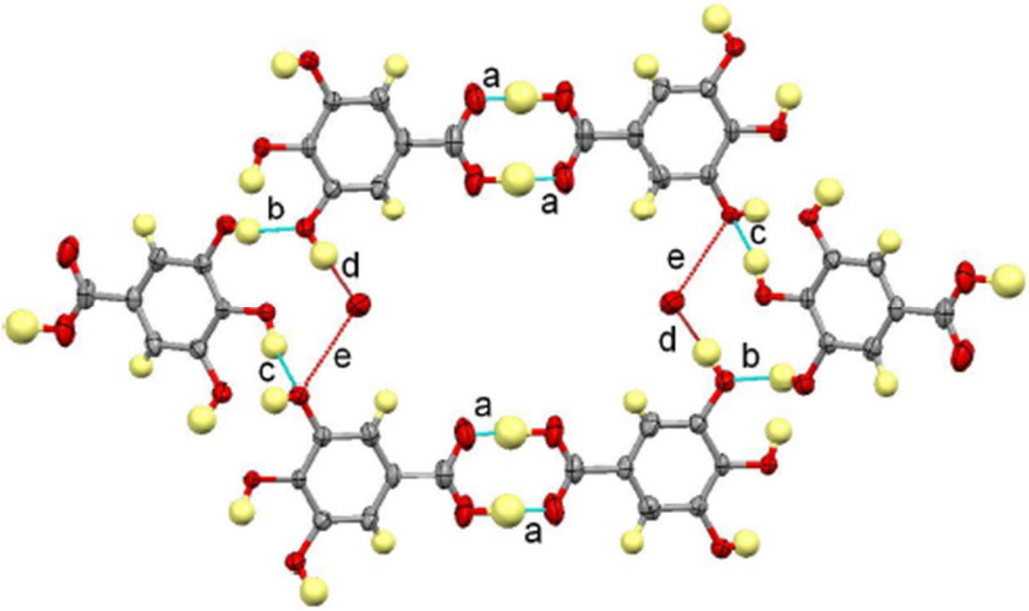
FONTE: FARRUGIA (2012).

O diagrama Ortep foi desenhado a partir do arquivo de informação cristalográfica (Crystallographic Information File, CIF) obtido na base de dados do CCDC para o código 1451205. Os deslocamentos dos elipsoides são mostrados com 50% de probabilidade (FARRUGIA, 2012).

A estrutura de $C_7H_6O_5.H_2O$ é porosa e está reportada na literatura. Nela há uma única molécula de ácido gálico (AG) e uma única molécula de água na unidade assimétrica. As moléculas de AG dimerizam através de seus ácidos carboxílicos, e os dímeros são formados por ligações de hidrogênio moderadamente fortes (“a” na FIGURA 16). As ligações de hidrogênio mais fracas entre os grupos de hidroxilas (“b” e “c” na FIGURA 16), ligam as moléculas de AG em grandes anéis, originando a estrutura dos canais (THOMAS et al., 2016).

A hidroxila, presente em uma molécula de AG, forma uma ligação de hidrogênio moderadamente forte ao oxigênio da água (“d” na FIGURA 16). Assim, a água parece formar uma nova ligação de hidrogênio, moderadamente forte, ao oxigênio da hidroxila de outro AG (“e” na FIGURA 16) (THOMAS et al., 2016).

FIGURA 16 - CANAL OBSERVADO NA FORMA POROSA DE ÁCIDO GÁLICO MONOHIDRATADO

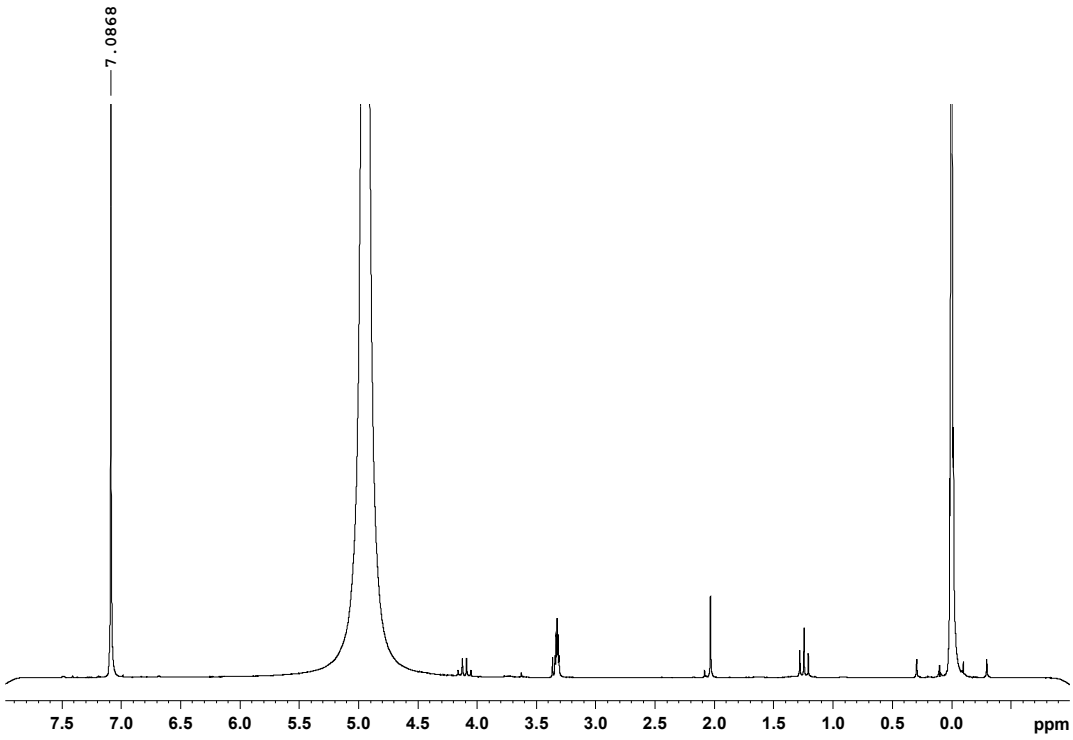


FONTE: THOMAS et al. (2016).

4.7.3 Ressonância Magnética Nuclear

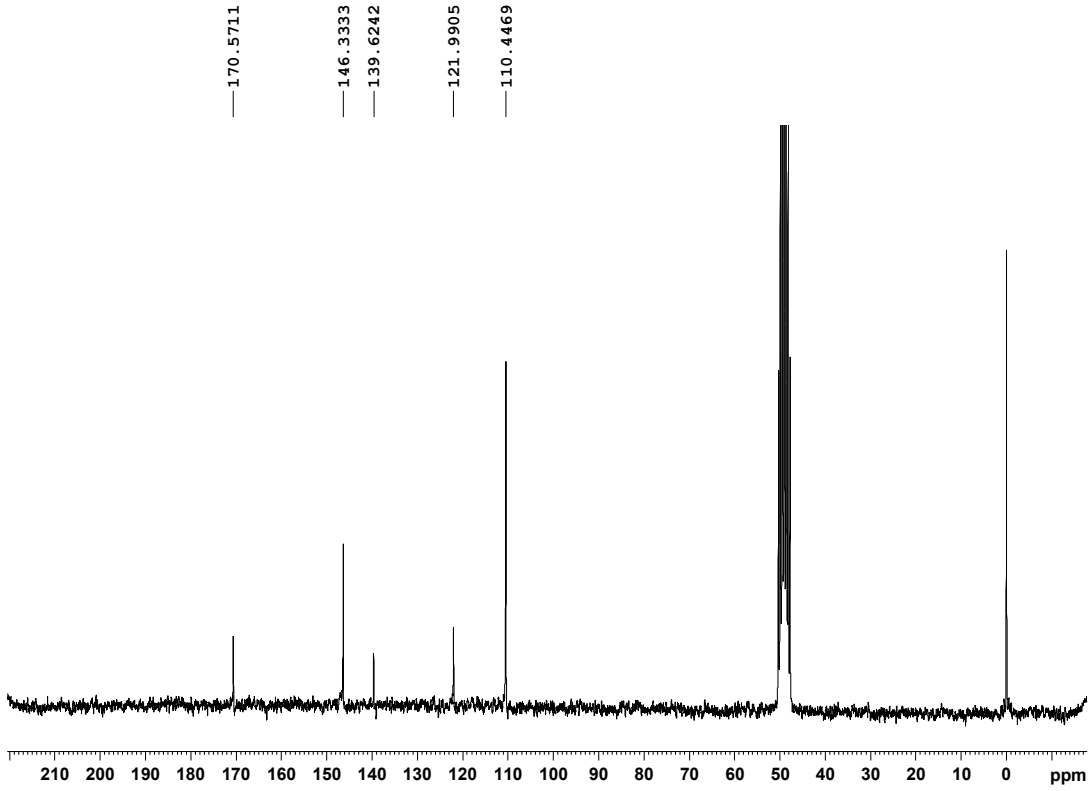
A identificação do cristal de ácido gálico isolado também foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear, conforme análise dos espectros de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ apresentados na FIGURA 17 e FIGURA 18, respectivamente.

FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H (CD_3OD-*d4*, 200 MHz) DO CRISTAL ISOLADO



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}C\{^{1}H\}$ (CD_3OD-*d4*, 50 MHz) DO CRISTAL ISOLADO



FONTE: O autor (2017).

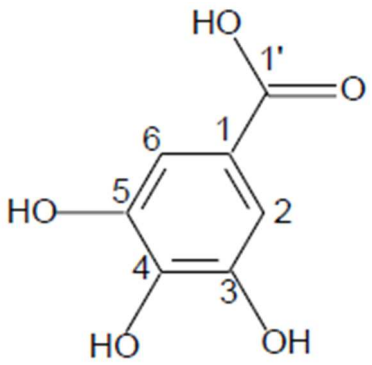
A partir da visualização e interpretação dos resultados, nota-se que os picos presentes nos espectros de ^{1}H e $^{13}C\{^{1}H\}$ coincidem com os picos presentes nos espectros de ácido gálico reportados na literatura, dentre eles para *Myrcia guianensis* (SOUZA et al., 2006). A TABELA 11 apresenta os dados deste estudo comparados aos obtidos experimentalmente para o cristal isolado e a FIGURA 19 traz a disposição dos átomos de carbono para a elucidação da molécula.

TABELA 11 - DADOS DE RMN DE ^{1}H E $^{13}C\{^{1}H\}$ PARA O CRISTAL ISOLADO, EM CD_3OD

POSIÇÃO	δ_C		δ_H	
	Experimental	Literatura[a]	Experimental	Literatura[a]
2, 6	110,45	110,3	7,09 s	7,05 s
1	121,99	121,9		
4	139,62	139,6		
3, 5	146,33	146,4		
1’	170,57	170,4		

FONTE: O autor (2017).
NOTA: [a]Dados de ^{1}H e ^{13}C $\{^{1}H\}$ do ácido gálico, em CD_3OD, de acordo com Souza et al. (2016).

FIGURA 19 – DISPOSIÇÃO DOS ÁTOMOS DE CARBONO NA MOLÉCULA DE ÁCIDO GÁLICO



FONTE: O autor (2017).

Por se tratar de uma molécula simétrica, o espectro de RMN ^{1}H do ácido gálico mostrou apenas um simpleto em δ_H 7,09 (2H, s), o que indica a presença de um anel aromático tetra substituído, que é atribuído aos dois hidrogênios equivalentes localizados na posição 2 e 6 do anel aromático. Como estes dois hidrogênios estão no mesmo ambiente químico e são os únicos presentes na molécula, eles fornecem um único sinal no espectro de ^{1}H.

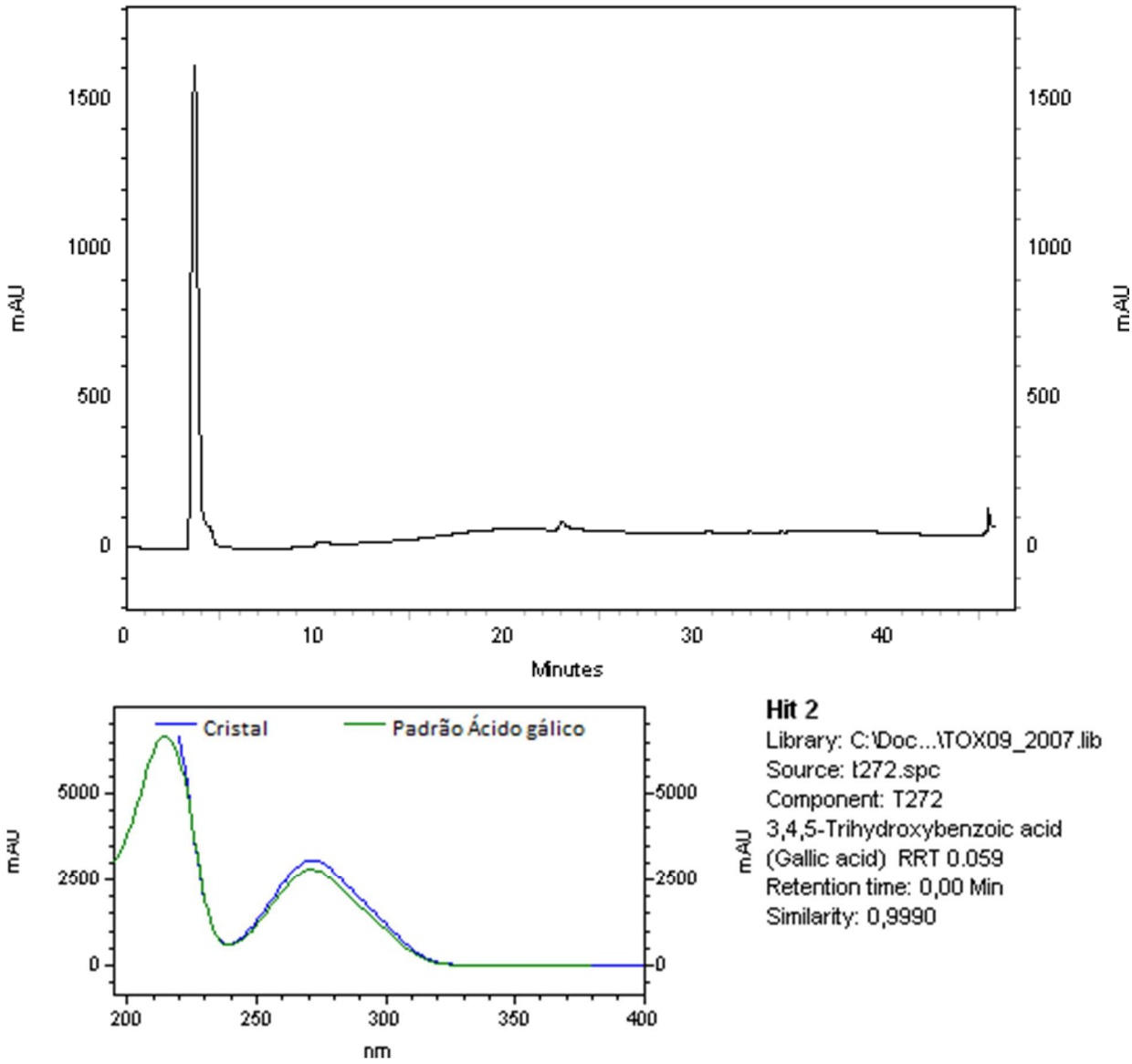
No espectro de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$ foram observados cinco sinais de ressonância, um sinal em δ_C 170,57 referente ao carbono da posição 1’, com deslocamento químico

característico de grupamento carbonila. Também estão presentes dois sinais em δ_C 110,45 (posição 2 e 6) e δ_C 146,33 (posição 3 e 5) atribuídos aos carbonos simétricos presentes no anel aromático, um sinal em δ_C 121,99 (posição 1) e um sinal em δ_C 139,62 (posição 4).

4.7.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O cromatograma do cristal isolado da fração acetato de etila apresentou apenas um pico majoritário, no tempo de retenção de 3,90 minutos e comprimento de onda máximo de 272 nm. A identidade do composto pode ser comprovada, com o auxílio de uma biblioteca espectral, pela sobreposição dos espectros do cristal e de uma substância padrão, no qual obteve similaridade de 99,9%. Na FIGURA 20, estes resultados podem ser melhor visualizados.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA E SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL DO CRISTAL ISOLADO



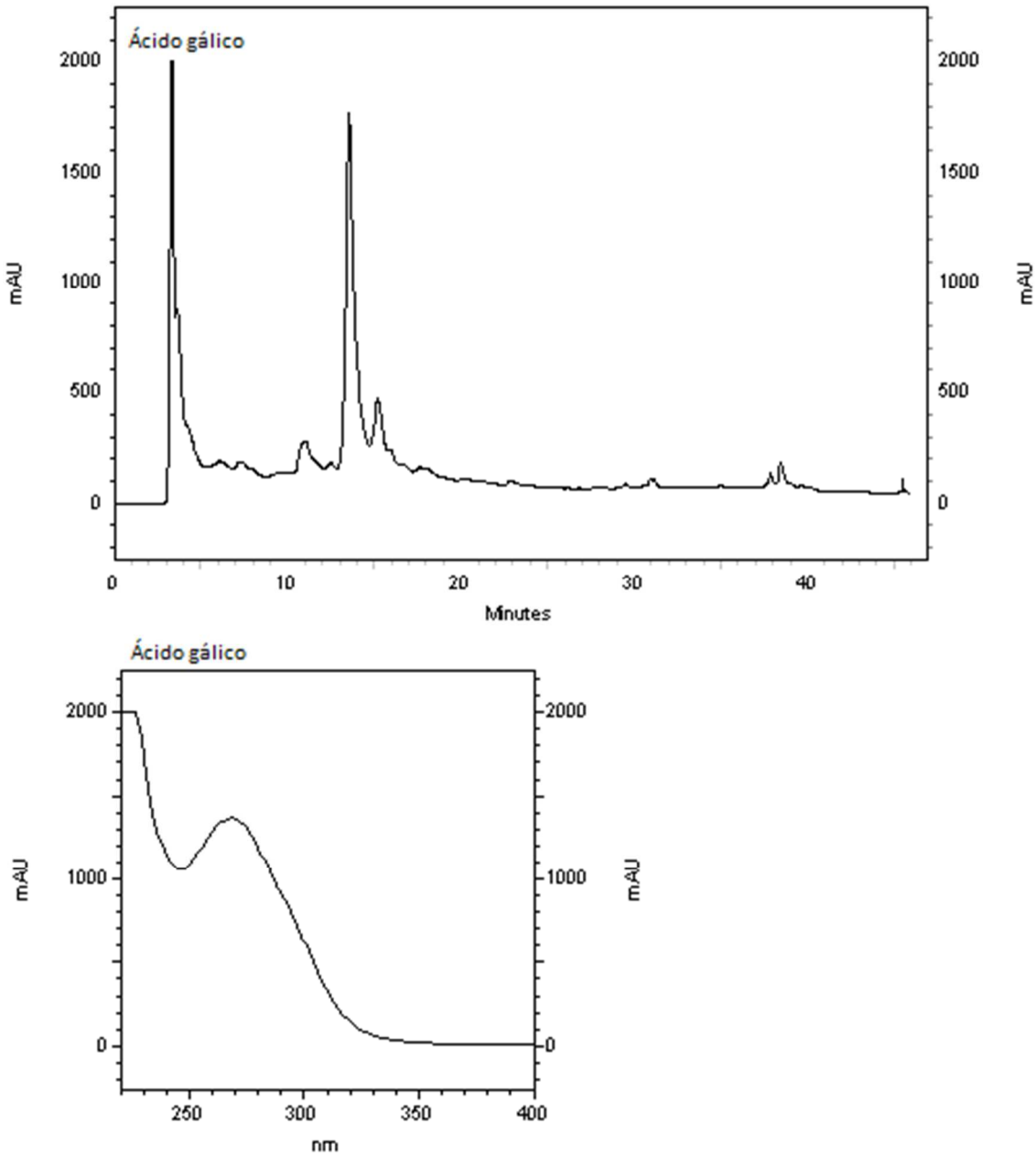
FONTE: O autor (2017).

O composto isolado também esteve presente no extrato bruto (FIGURA 21) e frações clorofórmio (FIGURA 22) e acetato de etila (FIGURA 23) dos materiais foliares, apresentando tempos de retenção próximos e a mesma característica espectral que o padrão presente na biblioteca. Além do ácido gálico, houve o aparecimento de outros picos nestas amostras, os quais requerem análises posteriores para serem identificados.

A fração remanescente também apresentou um pico com tempo de retenção próximo ao do cristal, mas analisando e comparando a sobreposição espectral, este pico não apresenta a mesma característica que o padrão presente na biblioteca.

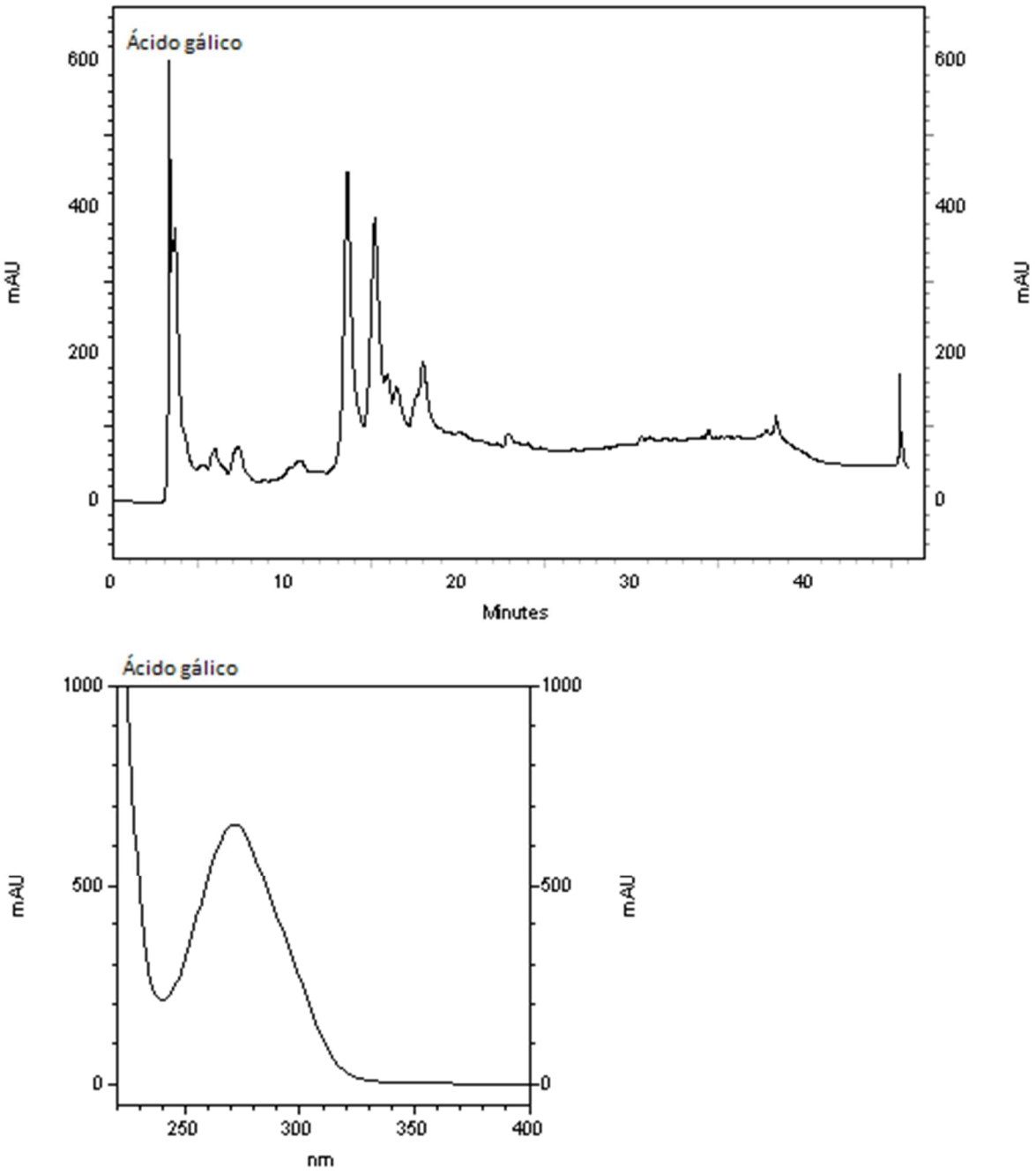
Portanto, pela análise de CLAE, não foi possível identificar o ácido gálico na fração remanescente.

FIGURA 21 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DO EXTRATO BRUTO FOLHA



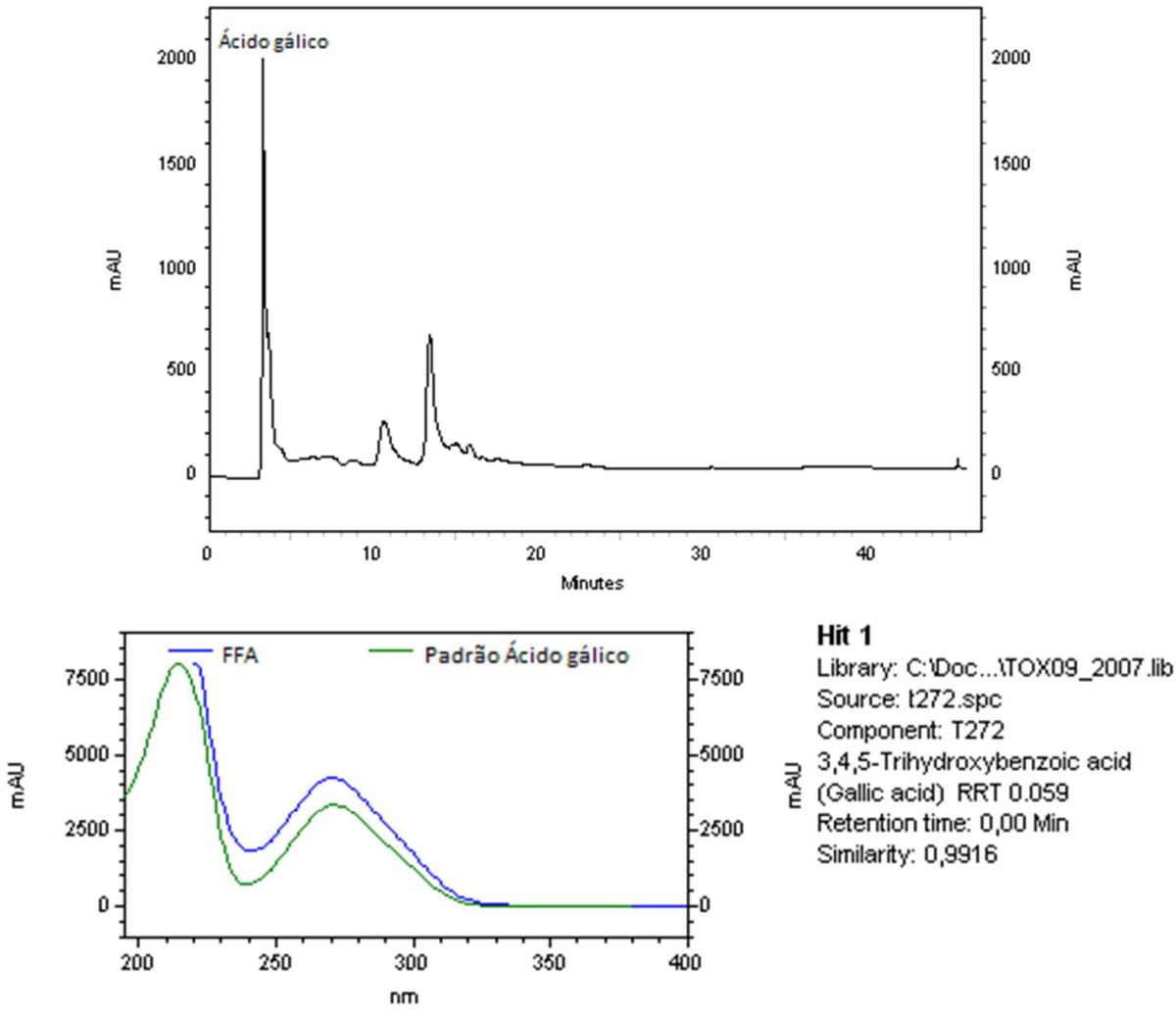
FONTE: O autor (2017).

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA E ESPECTRO DA FRAÇÃO FOLHA CLOROFÓRMIO



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 23 - CROMATOGRAMA E SOBREPOSIÇÃO ESPECTRAL DA FRAÇÃO FOLHA ACETATO DE ETILA



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Fração folha acetato d etila (FFA).

4.7.5 Ácido gálico

O ácido gálico é um ácido orgânico trifenólico, de baixo peso molecular e coloração branco amarelada. É encontrado, na forma livre ou como parte de derivados de éster e polímeros, em muitas espécies vegetais, incluindo alimentos de consumo humano. Possui aplicações na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

Algumas das utilizações farmacológicas e clínicas relatadas deste composto dizem respeito as propriedades antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimelanogênico, antimutagênico, antiviral, antialérgico, neuroproteção e hepatoproteção (JANG et al., 2009; VERMA et al., 2013; BADHANI et al., 2015; CAN et al., 2017; RAJAN; MURALEEDHARAN, 2017).

A atividade antioxidante do ácido gálico é bastante conhecida. Os três grupos hidroxilas ligados ao anel aromático na posição orto, um em relação ao outro, é o principal determinante desta propriedade. O ácido gálico fornece uma proteção eficiente contra danos oxidativos causados por espécies reativas encontradas nos sistemas biológicos, incluindo grupos hidroxil, superóxido e peroxil; e de espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Além disto, tem sido demonstrado como o principal componente antioxidante responsável pela atividade anticancerígena de extratos de plantas (BADHANI et al., 2015).

O ácido gálico possui efeito inibitório na proliferação de células cancerígenas e juntamente com outros compostos fenólicos, podem exercer um efeito quimiopreventivo e anticancerígeno sobre o estresse oxidativo e a sinalização intracelular dependente de espécies reativas de oxigênio através de efeitos sinérgicos. (GAWLIK-DZIKI et al., 2013).

A propriedade pró-oxidante do ácido gálico está relacionada a indução de apoptose em linhagens celulares cancerígenas. Seu efeito de apoptose pode ser observado no câncer de estômago, adenocarcinoma de cólon, carcinoma de próstata e câncer de pulmão. Além disto, o ácido gálico mostrou uma citotoxicidade seletiva contra uma variedade de células tumorais e uma baixa toxicidade em células normais (VERMA et al., 2013).

4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante permite um direcionamento para possíveis atividades farmacológicas, sendo avaliada por dois métodos diferentes.

4.8.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Este ensaio tem como princípio a avaliação da oxidação ocorrida no reativo, por compostos lipofílicos e hidrofílicos. As amostras (extratos brutos, frações e óleo essencial) foram calculadas utilizando como padrões comparativos: BHT, Rutina e o Ácido ascórbico, cujas atividades foram consideradas como 100%. Os resultados obtidos estão expressos na TABELA 12, TABELA 13 e TABELA 14.

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT

AMOSTRA	AAR% (BHT) ± DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
FFH	25,28±0,96	a1
FGH	27,83±0,45	a1
EBG	38,00±1,18	a2
FGC	49,26±0,98	a3
EBF	49,60±1,43	a3 a4
FGR	54,52±1,93	a4 a5
FFC	54,90±2,51	a5
FFR	56,49±2,70	a5
OE	65,09±2,17	a6
FGA	83,18±2,19	a7
FFA	92,62±1,52	a8
BHT	100	a9

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Atividade Antioxidante Relativa (AAR%), Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 13 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À RUTINA

AMOSTRA	AAR% (Rutina) ± DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
FFH	60,96±2,32	a1
FGH	69,41±1,13	a1
EBG	83,59±2,59	a2
Rutina	100	a3
FGR	119,29±4,22	a4
FFC	120,88±5,52	a4
FGC	122,85±2,44	a4 a5
EBF	125,47±3,62	a4 a5
FFR	129,52±6,20	a4 a5
OE	132,46±4,41	a5
FGA	181,99±4,80	a6
FFA	203,95±3,35	a7

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Atividade Antioxidante Relativa (AAR%), Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)

AMOSTRA	AAR% (Vit C) ± DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
FFH	16,32±0,62	a1
FGH	16,60±0,27	a1
EBG	21,52±0,67	a2
EBF	28,37±0,82	a3
FGC	29,38±0,58	a3 a4
FFC	31,08±1,42	a3 a4 a5
FGR	32,04±1,13	a4 a5
FFR	33,97±1,63	a5
OE	37,32±1,24	a6
FGA	48,88±1,29	a7
FFA	52,44±0,86	a8
Vit C	100	a9

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Atividade Antioxidante Relativa (AAR%), Desvio Padrão (DP), Ácido ascórbico/ Vitamina C (Vit C), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

A partir dos dados representados nas tabelas, podemos verificar que todas as amostras demonstraram atividade antioxidante por formação do complexo fosfomolibdênio, especialmente as Frações acetato de etila. As amostras testadas apresentaram atividade antioxidante com resultados mais significativos frente à Rutina, seguidos de BHT e Ácido ascórbico.

Os resultados encontrados de AAR% frente à Rutina foram bastante satisfatórios, pois apenas o Extrato bruto de galho e Frações hexano (folhas e galhos) apresentaram resultados estatisticamente inferiores ao padrão. As demais amostras testadas obtiveram resultados superiores a 100%, com destaque para a Fração folha acetato de etila com 203,95%.

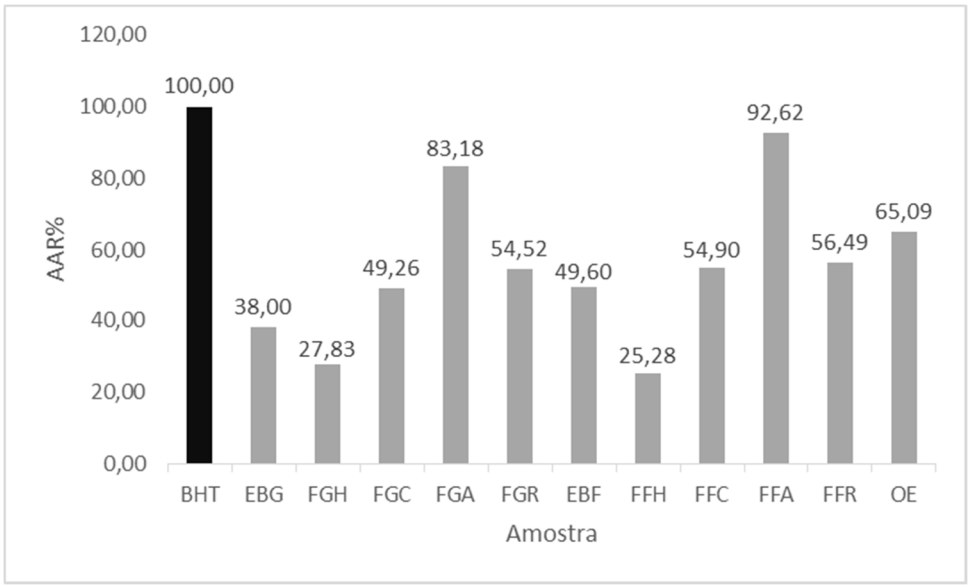
Considerando os resultados frente ao BHT, observamos que não foram tão altos quanto aos da Rutina, mas ainda assim são relevantes. As Frações acetato de etila foram as que mais se aproximaram estatisticamente do padrão BHT, com resultados de 83,18% para galhos e 92,62% para folhas. A fração com menor atividade antioxidante foi a Hexano a partir de folhas, com 25,28%.

Embora os resultados em relação ao Ácido ascórbico tenham sido menores do que os obtidos em comparação a Rutina e BHT, as Frações acetato de etila demonstraram resultados consideráveis com 48,88% para galhos e 52,44% para folhas.

O óleo essencial também se destacou com sua atividade antioxidante, obtendo resultados expressivos: 132,46% frente à Rutina, 65,09% frente ao BHT e 37,32% frente ao Ácido ascórbico.

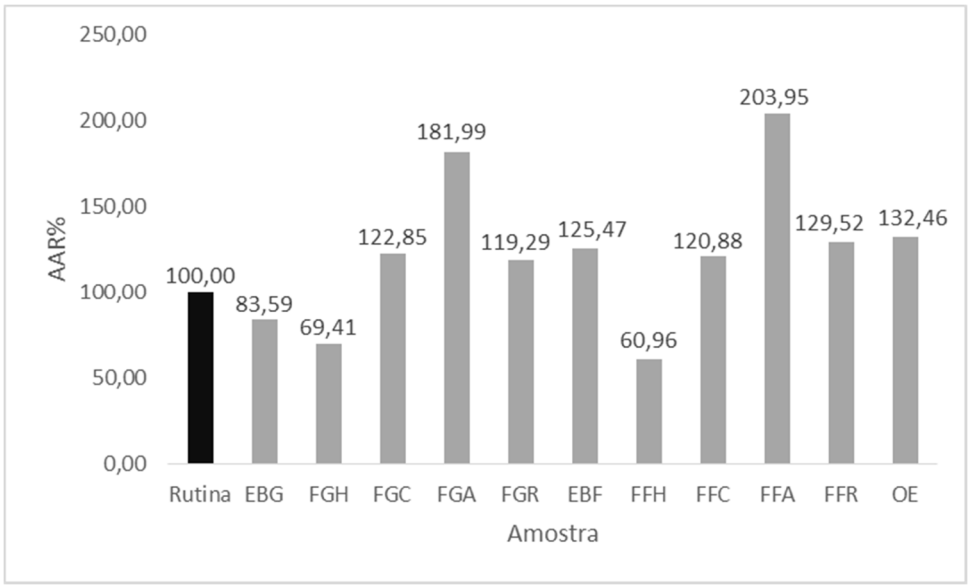
O GRÁFICO 1, GRÁFICO 2 e GRÁFICO 3 apresentam os resultados do ensaio antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, onde as barras em preto são os padrões e as barras em cinza são as amostras de *Myrcia hatschbachii.*

GRÁFICO 1 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO BHT



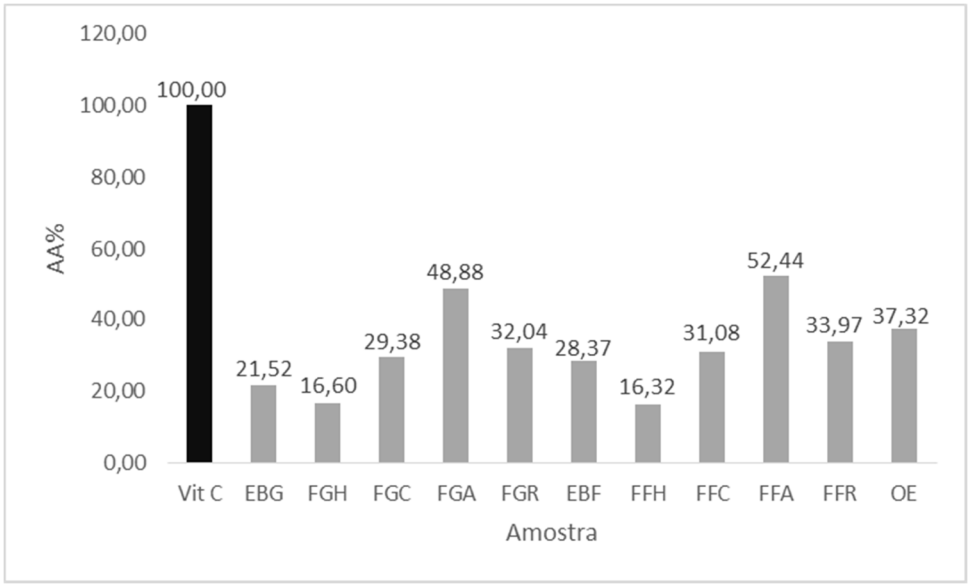
FONTE: O autor (2017).
NOTA: Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE).

GRÁFICO 2 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS À RUTINA



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE).

GRÁFICO 3 - CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Ácido ascórbico/ Vitamina C (Vit C), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE).

4.8.2 Redução do radical DPPH•

Determinadas substâncias possuem a capacidade de sequestrar o radical livre DPPH•, doando para ele um átomo de hidrogênio, e consequentemente reduzindo-o a hidrazina (coloração amarela). Deste modo, ocorre a mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância, produzida pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH•.

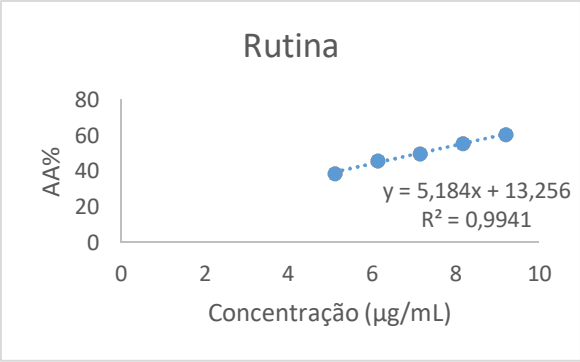
Este método é considerado um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides (ALVES et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (% de DPPH• que não foi reduzida a hidrazina). Para cada amostra e padrão testados foram calculados a IC_{50} por regressão linear, onde foi plotado um gráfico em que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da atividade antioxidante (AA%) das amostras de cada concentração.

O GRÁFICO 4 apresenta as curvas de calibração utilizadas para a determinação da IC_{50} dos padrões utilizados e o GRÁFICO 5 para as amostras testadas.

GRÁFICO 4 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•

(continua)



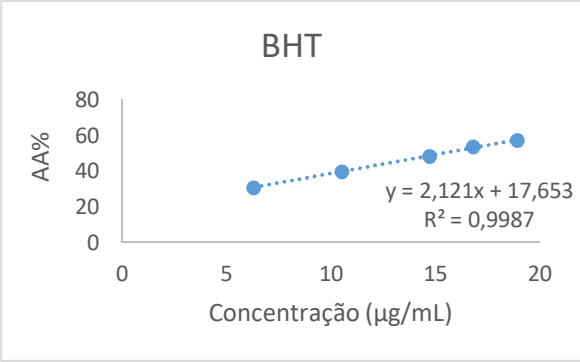
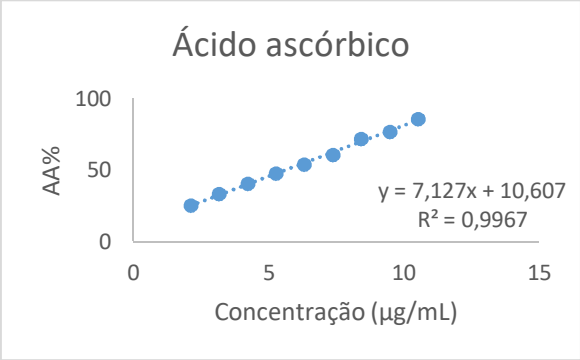


GRÁFICO 4 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PADRÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•

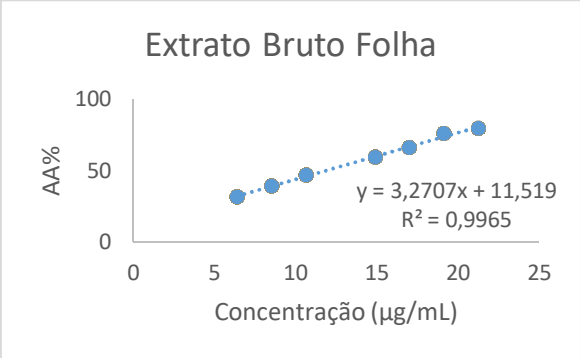
(continuação)

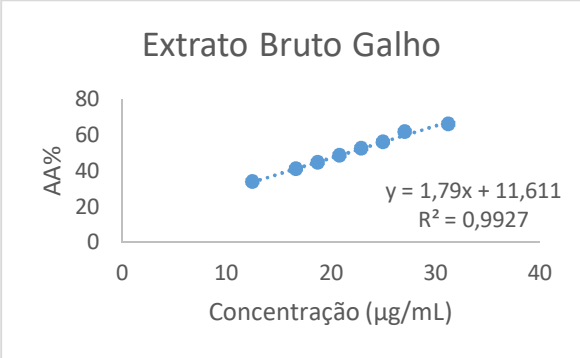


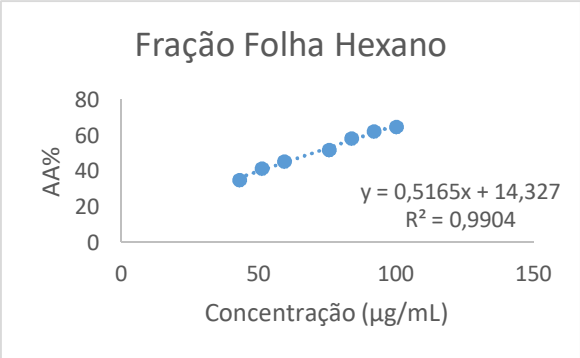
FONTE: O autor (2017).

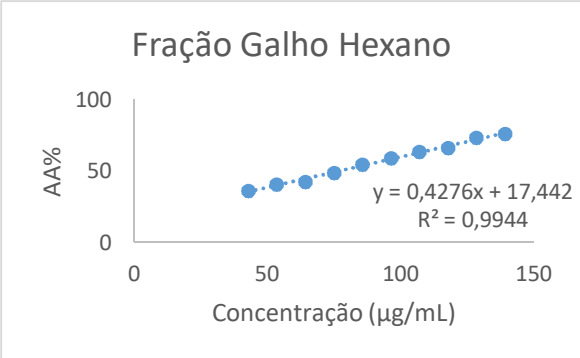
GRÁFICO 5 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•

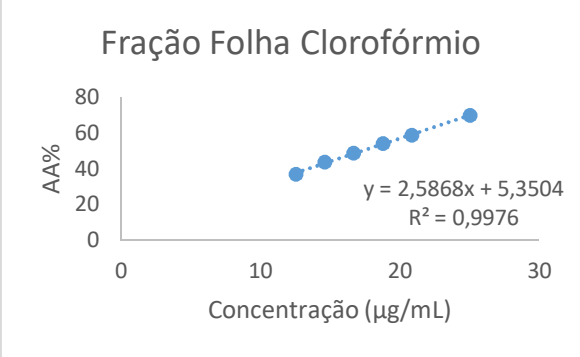
(continua)











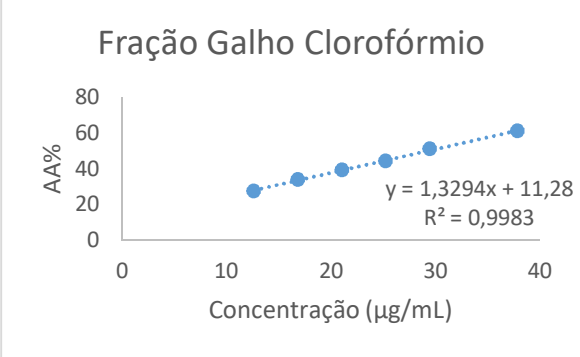
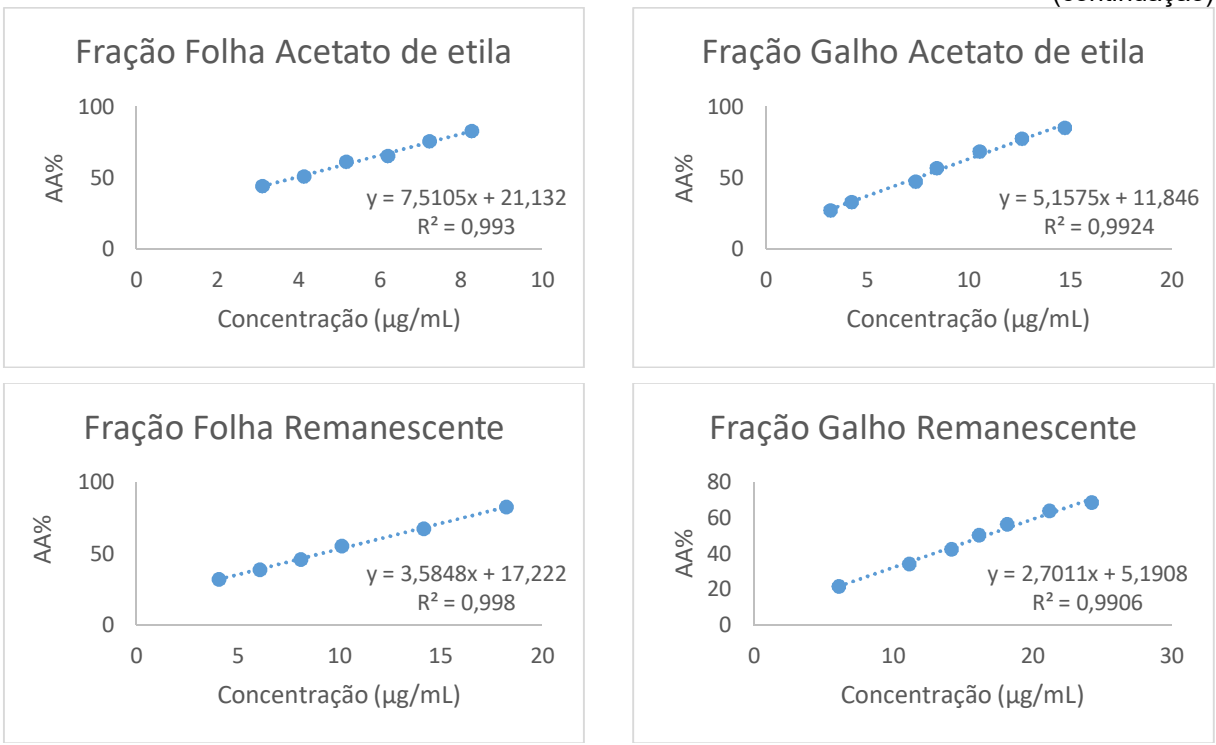


GRÁFICO 5 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES PELA REDUÇÃO DO DPPH•

(continuação)



FONTE: O autor (2017).

A partir das curvas de calibração obtidas foi possível determinar a IC_{50}, concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ou reduzir 50% da concentração inicial de DPPH•. Estes resultados estão representados, por suas médias, na TABELA 15.

TABELA 15 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• DE EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E PADRÕES

AMOSTRA	IC_{50} µg/mL ±DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
FFA	3,84 ±0,11	a1
Ácido ascórbico	5,53 ±0,03	a2
Rutina	7,09 ±0,15	a3
FGA	7,40 ±0,17	a3
FFR	9,15 ±0,38	a4
EBF	11,77 ±0,14	a5
BHT	15,25 ±0,05	a6
FGR	16,60 ±0,25	a6 a7
FFC	17,27 ±0,21	a7
EBG	21,45 ±0,33	a8
FGC	29,14 ±0,55	a9
FFH	69,07 ±0,87	a10
FGH	76,12 ±1,22	a11

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

As amostras foram comparadas aos padrões Rutina, BHT e Ácido ascórbico e através dos testes estatísticos de análise de variância – Tukey e Anova – chegou-se em 11 grupos que diferem-se entre si das 10 amostras testadas.

A Fração folha acetato de etila foi a que apresentou melhor IC_{50} (3,84 µg/mL), sendo este resultado inferior aos três padrões utilizados. Assim, em baixas concentrações, a fração é capaz de reduzir 50% de DPPH• do meio reacional, evidenciando sua relevante atividade antioxidante.

As amostras das frações galho acetato de etila, folha remanescente e extrato bruto de folha apresentaram resultados de IC_{50} superiores a Rutina e Ácido ascórbico, porém inferiores ao BHT. Com isto, comparadas ao BHT, estas amostras apresentam melhores capacidades antioxidantes. As demais amostras também apresentaram atividade antioxidante, no entanto é necessária uma maior concentração das mesmas para reduzir 50% da concentração do radical DPPH•.

As frações que obtiveram as maiores concentrações de IC_{50} e mais se distanciaram dos padrões foram as hexânicas, com 69,07 µg/mL para folhas e 76,12 µg/mL para galhos.

Estudos com espécies do gênero também mostraram-se satisfatórios em relação ao potencial antioxidante, resultando em baixos valores de IC_{50} nos testes

realizados com extratos aquosos de folhas: 7,46 µg/mL para *Myrcia tomentosa*; 7,73 µg/mL para *Myrcia bella* e 7,80 µg/mL para *Myrcia lingua* (TAKAO et al., 2015). Extratos etanólicos das folhas de *Myrcia laruotteana* e *Myrcia obtecta* apresentaram IC_{50} de 3,38 µg/mL e 6,66 µg/mL, respectivamente (SALVADOR et al., 2011).

Extrato bruto etanólico e Frações hexano e acetato de etila de folhas e pecíolos de *Myrcia splendens* obtiveram resultados de IC_{50} de 10,14 µg/mL para extrato bruto, 117,47 µg/mL para fração hexano e 8,44 µg/mL para fração acetato de etila. Já para *Myrcia palustres,* os resultados foram de 29,81 µg/mL, > 200 µg/mL e 17,83 µg/mL, para extrato bruto, fração hexano e fração acetato de etila, respectivamente (MORESCO et al., 2014).

As amostras de óleo essencial foram preparadas na concentração de 200 µg/mL e os resultados obtidos de atividade antioxidante foram comparados aos padrões de mesma concentração. Como podemos observar na TABELA 16, o óleo essencial apresenta uma atividade antioxidante significativamente inferior comparado à Rutina, Ácido ascórbico e BHT. Por isto, não foi considerada viável a determinação da IC_{50} para ele, visto que necessitaria de uma grande quantidade de amostra para o preparo.

TABELA 16 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• DE ÓLEO ESSENCIAL

AMOSTRA	AA% ± DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY		
Óleo essencial	9,14 ± 0,33	a1		
Rutina	94,86 ± 0,66		a2	
BHT	93,78 ± 1,08		a2	
Ácido ascórbico	96,66 ± 0,45			a3

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Atividade Antioxidante (AA%), Desvio Padrão (DP), Hidroxitolueno butilado (BHT).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p<0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

4.8.3 Discussão dos resultados de atividades antioxidantes

Os dois métodos executados testam a atividade antioxidante das amostras por diferentes mecanismos: redução do radical livre DPPH• e formação do complexo Fosfomolibdênio. Em ambos os métodos, utilizam-se os mesmos padrões para

comparação das atividades: Rutina, Ácido ascórbico e BHT. Estes foram escolhidos por apresentarem características distintas.

O Ácido ascórbico, que pode ser obtido de forma natural ou sintética, é um potente sequestrador para radicais hidrofílicos, mas fraco frente à radicais lipofílicos. Assim, ele possui um caráter hidrofílico e sua cinética de reação é rápida (ocorrendo em segundos). Já o BHT é de origem sintética, possui caráter lipofílico e sua cinética de reação é lenta (ALVES et al., 2010). A Rutina, por ser uma flavonoide, tem sua atividade antioxidante bastante conhecida.

Nos dois métodos realizados, todas as amostras testadas apresentaram atividade antioxidante, sendo que as Frações folha e galho acetato de etila foram as que mostraram os resultados ainda mais significativos. Isto corrobora com os screenings de marcha fitoquímica e CCD, onde foram encontrados a presença de compostos fenólicos (taninos, flavonoides e cumarinas). Os compostos fenólicos também estiveram evidentes nos testes histoquímicos no estudo morfoanatômico, sendo encontrado nas folhas, pecíolos e galhos. Além destes ensaios, foi na fração folha acetato de etila que obteve-se o ácido gálico isolado, um composto fenólico derivado do ácido hidroxibenzoico.

Outro fator importante a ser destacado é que as frações acetato de etila mostraram esta relevante atividade antioxidante, mas não apresentaram toxicidade no ensaio frente à *Artemia salina*, o qual será apresentado posteriormente. No teste de hemólise, a atividade apresentou resultado inferior a 10% na concentração de 1000 µg/mL para a fração a partir de folhas. Com isto, surgem possibilidades de novos estudos e aplicabilidades.

4.8.4 Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são muito conhecidos por suas propriedades antioxidantes. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas nas células aeróbicas como subprodutos do metabolismo do oxigênio, e quando a geração destas ERO é maior do que a capacidade antioxidante celular, surge o estresse oxidativo. Assim, a ERO pode oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, levando a morte ou transformação celular. Os compostos fenólicos podem atuar como agentes redutores, eliminadores de radicais livres, doadores de hidrogênio e inibidores de enzimas pró-oxidativas (GAWLIK-DZIKI et al., 2013).

As propriedades antioxidantes de compostos fenólicos está relacionada a sua capacidade de óxido-redução, desempenhando uma importante função na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais (agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo) e são eficazes na prevenção da peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio (SOARES, 2002).

Os polifenóis constituem uma classe importante de antioxidantes naturais e algumas de suas atividades biológicas são relatadas na literatura e abrangem propriedades anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antiúlceras e anticolesterol (BADHANI et al., 2015).

4.9 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.9.1 Atividade alelopática

O estudo da alelopatia é capaz de avaliar a capacidade de um vegetal em influenciar o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agronômicos através da liberação de compostos químicos no meio ambiente, denominados como aleloquímicos (REIGOSA et al., 2013).

Os aleloquímicos se acumulam predominantemente nas folhas, mas podem ocorrer em todos os órgãos da planta. Após serem liberados, eles causam efeitos sobre organismos e o meio ambiente, interferindo no crescimento e desenvolvimento das plantas, com alterações a nível celular, função de membrana, fito-hormônios, fotossíntese e absorção de nutrientes (FRANCO et al., 2015).

Este teste é um modelo de estudo preliminar da divisão celular vegetal, servindo como base para o direcionamento de possíveis atividades farmacológicas e imunológicas. Para isto, foram avaliadas a capacidade da espécie *Myrcia hatschbachii* em influenciar a germinação e crescimento de *Lactuca sativa,* um exemplar de dicotiledônia.

Devido ao método de preparo de amostra de extrato bruto e frações ser diferente do preparo de óleo essencial, o processamento estatístico foi realizado separadamente para cada método de análise.

4.9.1.1 Germinação e IVG

Os resultados da influência dos extratos brutos e frações de *Myrcia hatschbachii* na germinação de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 17.

Como a germinação foi realizada em duas etapas (a primeira para extratos brutos e frações de folhas e a segunda para galhos), foram preparados controles metanol e água para cada teste. Por isso, no processamento estatístico da germinação há a presença de dois controles de água e dois controles de metanol.

TABELA 17 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

(continua)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE GERMINAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
EBF	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
FFH	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
FFC	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
FFA	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
FFR	100	5,0000	a3
	250	4,7500	a2
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
EBG	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
FGH	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	4,7500	a2

TABELA 17 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NA GERMINAÇÃO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

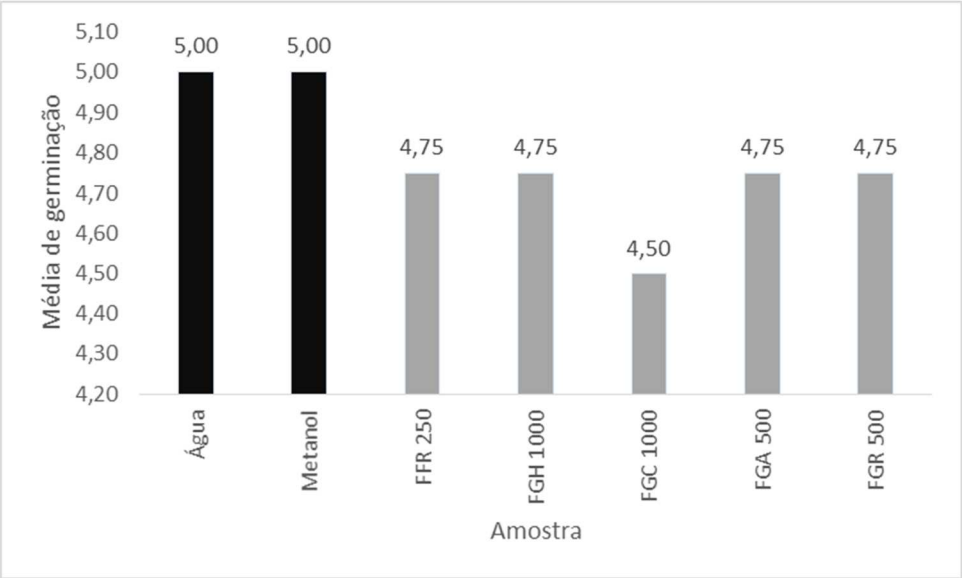
(continuação)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE GERMINAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
FGC	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	4,5000	a1
FGA	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	4,7500	a2
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
FGR	100	5,0000	a3
	250	5,0000	a3
	500	4,7500	a2
	750	5,0000	a3
	1000	5,0000	a3
Controle	Água 1 e 2	5,0000	a3
	Metanol 1 e 2	5,0000	a3

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Como pode-se observar, a fração que mais se distanciou estatisticamente dos controles água e metanol (grupo a3), influenciando negativamente na germinação de *Lactuca sativa*, foi a clorofórmio de galho na concentração de 1000 µg/mL, pertencendo ao grupo a1. Além desta, outras frações que se destacaram na inibição da germinação foram a Fração folha remanescente (250 µg/mL), Fração galho hexano (1000 µg/mL), Fração galho acetato de etila (500 µg/mL) e Fração galho remanescente (500 µg/mL), pertencentes ao grupo a2. Uma melhor visualização destas frações comparadas aos controles podem ser observadas no GRÁFICO 6.

GRÁFICO 6 – FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Fração folha remanescente 250 µg/mL (FFR 250), Fração galho hexano 1000 µg/mL (FGH 1000), Fração galho clorofórmio 1000 µg/mL (FGC 1000), Fração galho acetato de etila 500 µg/mL (FGA 500), Fração galho remanescente 500 µg/mL (FGR 500).

Os resultados da influência de óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* na germinação de *Lactuca sativa* não apresentaram diferença estatística comparadas aos controle água e Polisorbato à 1% em água, ou seja, houve germinação de cinco sementes nos quatro quadrantes em todas as concentrações de amostras testadas e controles.

Nesta etapa também foi avaliado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) para extrato bruto, frações e óleo essencial.

Os resultados da influência dos extratos brutos e frações de *Myrcia hatschbachii* no Índice de Velocidade de Germinação de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 18.

Como o IVG é baseado na germinação, e esta foi realizada em duas etapas (a primeira para extratos brutos e frações de folhas e a segunda para galhos), foram preparados controles metanol e água para cada teste. Assim, há a presença de dois controles de água e dois controles de metanol no processamento estatístico do IVG.

TABELA 18 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO IVG DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

(continua)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE IVG	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
EBF	100	5,0000	a3
	250	4,6667	a3
	500	4,8750	a3
	750	4,5000	a3
	1000	4,7500	a3
FFH	100	5,0000	a3
	250	4,8125	a3
	500	4,4167	a3
	750	4,8750	a3
	1000	4,8750	a3
FFC	100	4,7083	a3
	250	4,8750	a3
	500	4,5083	a3
	750	4,7083	a3
	1000	4,7083	a3
FFA	100	4,8750	a3
	250	4,8750	a3
	500	5,0000	a3
	750	5,0000	a3
	1000	4,7917	a3
FFR	100	4,5625	a3
	250	4,7500	a3
	500	4,5417	a3
	750	4,8750	a3
	1000	4,8750	a3
EBG	100	4,7500	a3
	250	4,6250	a3
	500	4,0417	a2
	750	4,3274	a3
	1000	4,6250	a3
FGH	100	4,5000	a3
	250	4,5833	a3
	500	2,7500	a1
	750	3,7500	a2
	1000	4,1667	a2
FGC	100	4,8125	a3
	250	4,4583	a3
	500	4,7500	a3
	750	4,3333	a3
	1000	4,0208	a2
FGA	100	5,0000	a3
	250	4,7500	a3
	500	4,5000	a3
	750	4,7500	a3
	1000	4,7500	a3
FGR	100	4,1250	a2
	250	4,7083	a3
	500	4,1250	a2
	750	4,8750	a3
	1000	5,0000	a3

TABELA 18 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO IVG DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

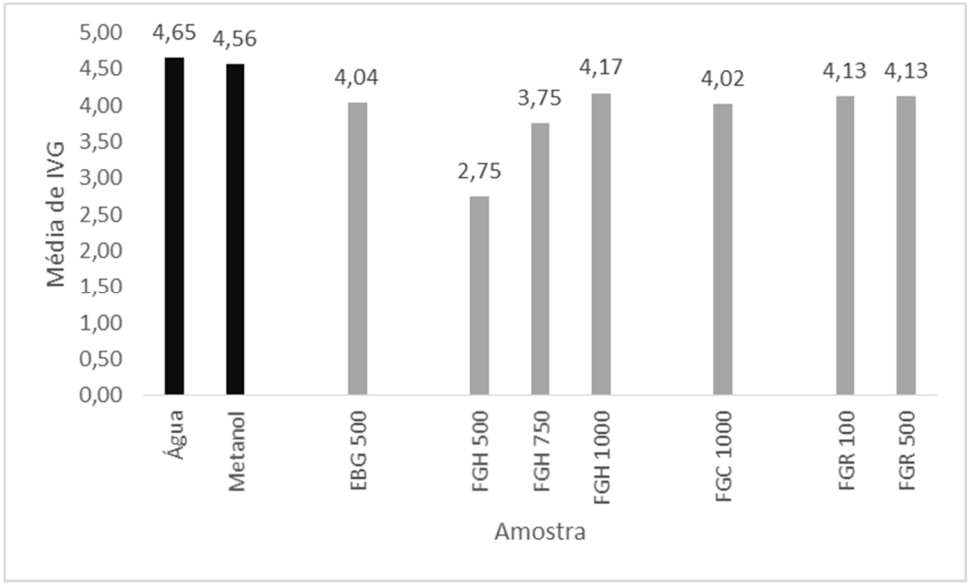
(continuação)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE IVG	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
Controle	Água 1	4,8000	a3
	Água 2	4,5000	a3
	Metanol 1	4,6250	a3
	Metanol 2	4,5000	a3

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

De acordo com a tabela, pode ser visualizado que a Fração galho hexano na concentração de 500 µg/mL, pertencente ao grupo a1, foi a que mais se distanciou estatisticamente dos controles água e metanol (grupo a3), influenciando negativamente na velocidade de germinação de *Lactuca sativa*. O Extrato bruto de galho (500 µg/mL) e as Frações galho: hexano (750 e 1000 µg/mL), clorofórmio (1000 µg/mL) e remanescente (100 e 500 µg/mL), pertencentes ao grupo a2, também influenciaram de forma restritiva na velocidade de germinação, em menor grau. Uma melhor visualização destas amostras comparadas às médias obtidas nos controles podem ser observadas no GRÁFICO 7.

GRÁFICO 7 – EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO ÍVG DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Extrato bruto galho 500 µg/mL (EBG 500); Fração galho hexano 500, 750 e 1000 µg/mL (FGH 500, FGH 750, FGH 1000); Fração galho clorofórmio 1000 µg/mL (FGC 1000); Fração galho remanescente 100 e 500 µg/mL (FGR 100, FGR 500).

Os resultados da influência de óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* no Índice de Velocidade de Germinação de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 19.

TABELA 19 - INFLUÊNCIA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* NO IVG DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA %	MÉDIA DE IVG	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
Óleo essencial	0,001	5,0000	a2
	0,01	4,5208	a2
	0,1	4,4583	a2
	1	3,3333	a1
Controle	Água	4,8750	a2
	Polisorbato à 1% em água	4,6250	a2

FONTE: O autor (2017).
NOTA: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

De acordo com os resultados apresentados, pode ser avaliado que apenas o Óleo essencial na concentração de 1%, pertencente ao grupo a1, é capaz de interferir negativamente na velocidade de germinação de *Lactuca sativa* quando comparados aos controles (grupo a2).

As alterações ocorridas no processo de germinação podem resultar de processos fisiológicos na semente, que são afetados por fitotoxinas, responsáveis pela supressão de atividades enzimáticas, ou fito-hormônios, relacionados a hidrólise dos materiais de reserva do embrião no início do desenvolvimento. Outros processos metabólicos são afetados, como a respiração, a fotossíntese, o fluxo de elementos do xilema, a permeabilidade da membrana, a divisão celular e o desenvolvimento e a síntese proteica (IMATOMI et al, 2015).

4.9.1.2 Hipocótilo

A verificação do crescimento foi realizada por meio da leitura do comprimento do hipocótilo após sete dias de armazenamento em estufa. Os resultados da influência dos extratos brutos e frações de *Myrcia hatschbachii* no crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 20.

TABELA 20 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

(continua)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE HIPOCÓTILO mm	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
EBF	100	28,7000	a1
	250	29,3500	a1
	500	28,9500	a1
	750	30,2000	a2
	1000	33,6000	a2
FFH	100	21,6000	a1
	250	25,3500	a1
	500	27,2500	a1
	750	24,0500	a1
	1000	20,8000	a1
FFC	100	27,2500	a1
	250	20,0500	a1
	500	24,2500	a1
	750	28,2500	a1
	1000	28,9500	a1
FFA	100	30,5000	a2
	250	32,7000	a2
	500	32,1000	a2
	750	28,3000	a1
	1000	27,7500	a1
FFR	100	30,9000	a2
	250	29,8500	a2
	500	40,7000	a3
	750	32,1000	a2
	1000	36,8500	a3

TABELA 20 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

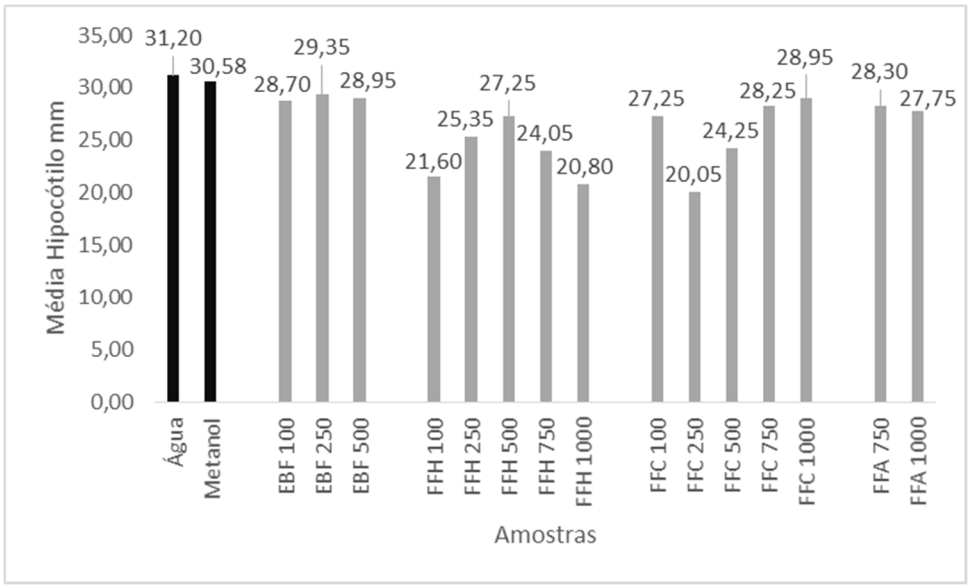
(continuação)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE HIPOCÓTILO mm	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT		
EBG	100	26,6000	a1		
	250	27,5500	a1		
	500	24,7000	a1		
	750	27,2000	a1		
	1000	26,3000	a1		
FGH	100	26,2500	a1		
	250	29,2500	a1		
	500	25,3500	a1		
	750	24,6500	a1		
	1000	26,1000	a1		
FGC	100	29,7500		a2	
	250	28,4500	a1		
	500	30,0000		a2	
	750	29,5500	a1		
	1000	28,3000	a1		
FGA	100	30,2000		a2	
	250	30,6500		a2	
	500	29,5000	a1		
	750	29,0000	a1		
	1000	31,4000		a2	
FGR	100	33,7000		a2	
	250	31,8000		a2	
	500	34,9000			a3
	750	37,8000			a3
	1000	37,2000			a3
Controle	Água	31,2000		a2	
	Metanol	30,5789		a2	

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

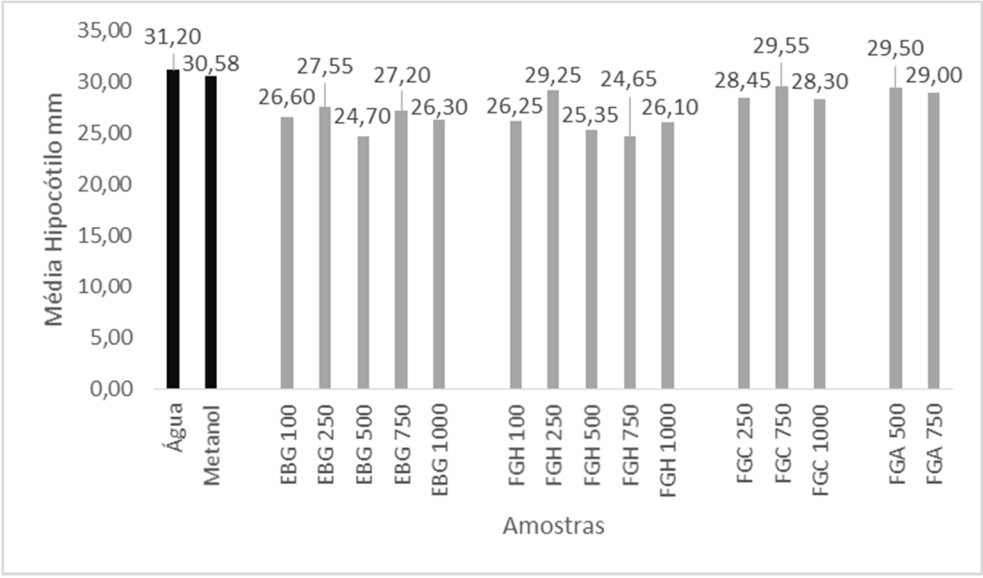
Como pode-se observar, o Extrato bruto de galho e as Frações: folha hexano, folha clorofórmio e galho hexano, pertencentes ao grupo a1, influenciaram negativamente, em todas as concentrações testadas, no crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* quando comparadas estatisticamente aos controles água e metanol (grupo a2). Também fazem parte do grupo a1, e portanto inibem o crescimento do hipocótilo, o Extrato bruto de folha (100, 250 e 500 µg/mL) e as Frações folha acetato de etila (750 e 1000 µg/mL), galho clorofórmio (250, 750 e 1000 µg/mL) e galho acetato de etila (500 e 750 µg/mL). Uma melhor visualização destes extratos brutos e frações comparados aos controles podem ser observados no GRÁFICO 8 para folhas e no GRÁFICO 9 para galhos.

GRÁFICO 8 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Extrato bruto de folha 100, 250 e 500 µg/mL (EBF 100, EBF 250, EBF 500); Fração folha hexano 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (FFH 100, FFH 250, FFH 500, FFH 750, FFH 1000); Fração folha clorofórmio 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (FFC 100, FFC 250, FFC 500, FFC 750, FFC 1000); Fração folha acetato de etila 750 e 1000 µg/mL (FFA 750, FFA 1000).

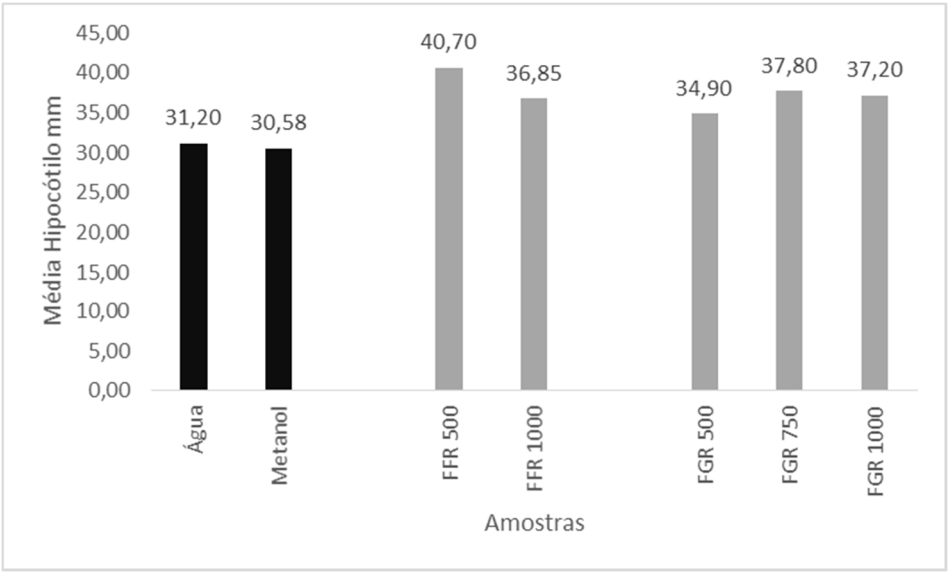
GRÁFICO 9 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE GALHOS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Extrato bruto de galho 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (EBG 100, EBG 250, EBG 500, EBG 750, EBG 1000); Fração galho hexano 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (FGH 100, FGH 250, FGH 500, FGH 750, FGH 1000); Fração galho clorofórmio 250, 750 e 1000 µg/mL (FGC 250, FGC 750, FGC 1000); Fração galho acetato de etila 500 e 750 µg/mL (FGA 500, FGA 750).

Por outro lado, a Fração remanescente estimulou o crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* quando comparadas estatisticamente aos controles água e metanol (grupo a2), nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL para folhas e 500, 750 e 1000 µg/mL para galhos, pertencendo assim ao grupo a3, como pode ser melhor visualizado no GRÁFICO 10. As demais concentrações das frações remanescentes permaneceram no mesmo grupo estatístico que os controles.

GRÁFICO 10 - FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM POSITIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Fração folha remanescente 500 e 1000 µg/mL (FFR 500, FFR 1000); Fração galho remanescente 500, 750 e 1000 µg/mL (FGR 500, FGR 750, FGR 1000).

Os resultados da influência de óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* no crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 21.

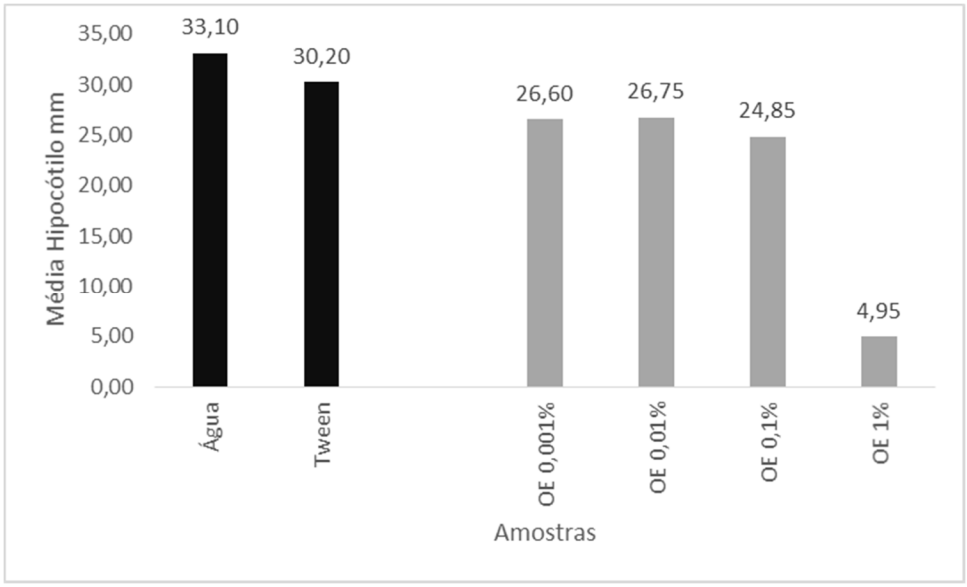
TABELA 21 - INFLUÊNCIA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA %	MÉDIA DE HIPOCÓTILO mm	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
Óleo essencial	0,001	26,60	a2
	0,01	26,75	a2
	0,1	24,85	a2
	1	4,95	a1
Controle	Água	33,10	a3
	Polisorbato à 1% em água	30,20	a3

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

Como pode ser visualizado, todas as concentrações de óleo essencial testadas apresentaram inibição no crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa*, sendo que a amostra à 1% (grupo a1) foi a que mais se distanciou estatisticamente dos controles água e Polisorbato à 1% em água (grupo a3). Estes dados podem ser melhores observados no GRÁFICO 11.

GRÁFICO 11 – AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Óleo essencial (OE).

4.9.1.3 Radícula

Estudos clássicos de alelopatia apresentam progresso ao longo dos anos, mas avanços moleculares precisam de investigações para o melhor entendimento da ação alelopática, principalmente em relação ao desenvolvimento radicular. A inibição do desenvolvimento da raiz devido a atividade alelopática é inicialmente atribuída por alteração na expressão dos genes (FRANCO et al., 2015).

Os resultados da influência dos extratos brutos e frações de *Myrcia hatschbachii* no crescimento da radícula de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 22.

TABELA 22 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

(continua)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE RADÍCULA mm	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT	
EBF	100	28,1000	a1	
	250	28,2000	a1	
	500	27,9000	a1	
	750	28,1000	a1	
	1000	28,4000	a1	
FFH	100	24,3500	a1	
	250	26,2500	a1	
	500	37,9500		a2
	750	25,9000	a1	
	1000	24,5500	a1	
FFC	100	29,7000	a1	
	250	23,1000	a1	
	500	23,2500	a1	
	750	28,6000	a1	
	1000	29,0000	a1	
FFA	100	36,6000		a2
	250	35,0000		a2
	500	29,5000	a1	
	750	32,8000		a2
	1000	31,7500		a2
FFR	100	31,9000		a2
	250	24,8000	a1	
	500	34,9000		a2
	750	25,6500	a1	
	1000	30,6500	a1	
EBG	100	30,5500	a1	
	250	30,5500	a1	
	500	28,5500	a1	
	750	30,3500	a1	
	1000	28,4000	a1	
FGH	100	32,3500		a2
	250	43,1000		a2
	500	30,6000	a1	
	750	27,0000	a1	
	1000	26,7000	a1	
FGC	100	26,7000	a1	
	250	28,6000	a1	
	500	28,1500	a1	
	750	30,2500	a1	
	1000	29,8000	a1	
FGA	100	37,8500		a2
	250	39,0500		a2
	500	32,8500		a2
	750	35,1500		a2
	1000	34,7000		a2
FGR	100	30,9500	a1	
	250	32,4000		a2
	500	28,5000	a1	
	750	33,9500		a2
	1000	28,9500	a1	

TABELA 22 - INFLUÊNCIA DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

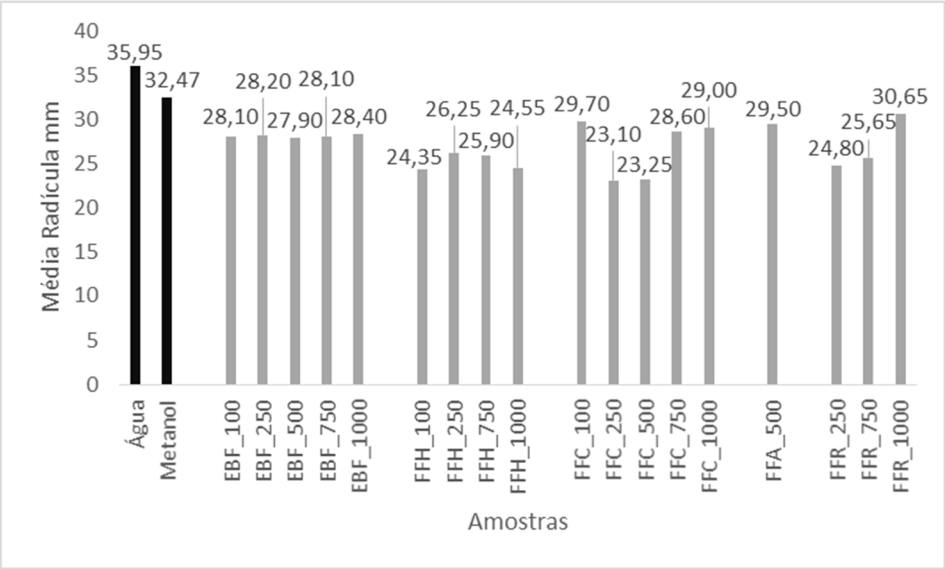
(continuação)

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA µg/mL	MÉDIA DE RADÍCULA mm	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
Controle	Água	35,9500	a2
	Metanol	32,4737	a2

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

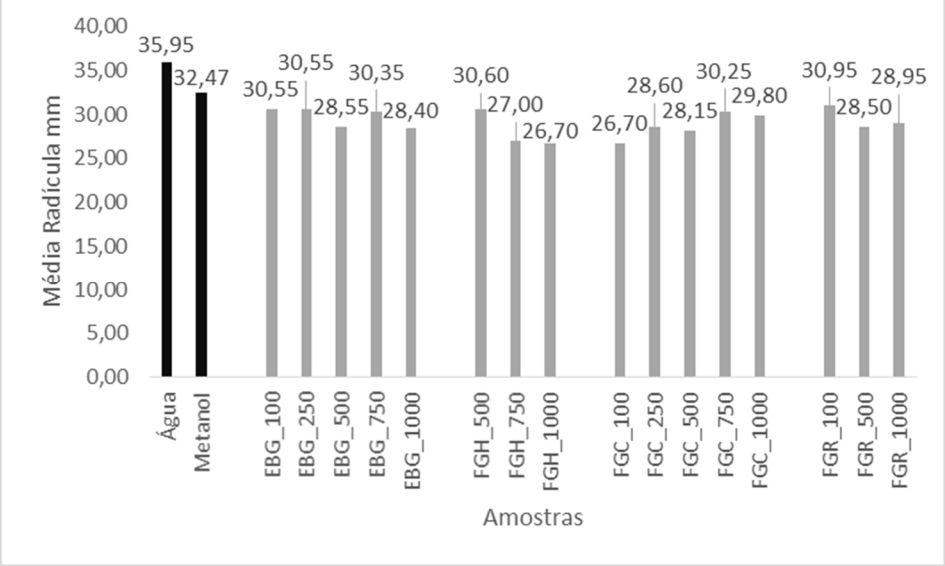
Segundo os dados estatísticos apresentados na tabela, os extratos brutos e frações clorofórmio (grupo a1), tanto de folha quanto de galho, apresentaram inibição do crescimento da radícula em todas as concentrações testadas, quando comparadas aos controles água e metanol (grupo a2). Além destas, outras amostras que influenciaram negativamente neste crescimento foram: Fração folha hexano (100, 250, 750 e 1000 µg/mL), Fração folha acetato de etila (500 µg/mL), Fração folha remanescente (250, 750 e 1000 µg/mL), Fração galho hexano (500, 750 e 1000 µg/mL) e Fração galho remanescente (100, 500 e 1000 µg/mL). Uma melhor visualização destes extratos brutos e frações comparados aos controles podem ser observados no GRÁFICO 12 para folhas e no GRÁFICO 13 para galhos.

GRÁFICO 12 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Extrato bruto de folha 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (EBF 100, EBF 250, EBF 500, EBF 750, EBF 1000); Fração folha hexano 100, 250, 750 e 1000 µg/mL (FFH 100, FFH 250, FFH 750, FFH 1000); Fração folha clorofórmio 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (FFC 100, FFC 250, FFC 500, FFC 750, FFC 1000); Fração folha acetato de etila 500 µg/mL (FFA 500); Fração folha remanescente 250, 750 e 1000 µg/mL (FFR 250, FFR 750, FFR 1000).

GRÁFICO 13 - EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE GALHOS DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Extrato bruto de galho 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (EBG 100, EBG 250, EBG 500, EBG 750, EBG 1000); Fração galho hexano 500, 750 e 1000 µg/mL (FGH 500, FGH 750, FGH 1000); Fração galho clorofórmio 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL (FGC 100, FGC 250, FGC 500, FGC 750, FGC 1000); Fração galho remanescente 100, 500 e 1000 µg/mL (FGR 100, FGR 500, FGR 1000).

Os resultados da influência de óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* no crescimento da radícula de *Lactuca sativa* podem ser observados na TABELA 23.

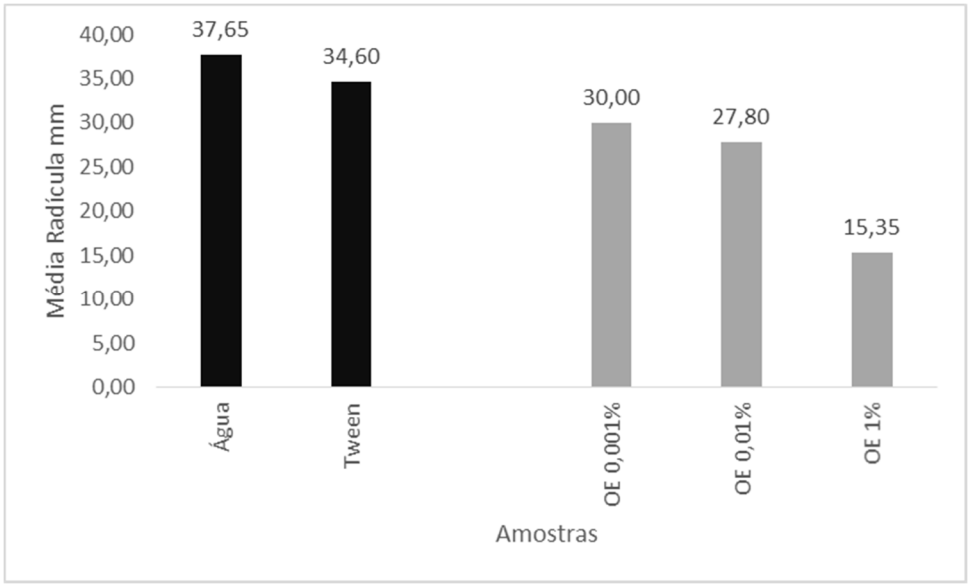
TABELA 23 - INFLUÊNCIA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* EM ENSAIO ALELOPÁTICO

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA %	MÉDIA DE RADÍCULA mm	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT
Óleo essencial	0,001	30,0000	a2
	0,01	27,8000	a2
	0,1	35,2000	a3
	1	15,3500	a1
Controle	Água	37,6500	a3
	Polisorbato à 1% em água	34,6000	a3

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Scott Knott.

O óleo essencial apresentou resultado mais significativo de inibição do crescimento radicular na concentração de 1% (grupo a1), sendo que as concentrações 0,001% e 0,01% (grupo a2) também apresentaram influência negativa de acordo com as análises estatísticas, comparados aos controles água e Polisorbato à 1% em água (grupo a3). Estes dados podem ser melhores observados no GRÁFICO 14.

GRÁFICO 14 - AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* QUE INFLUENCIARAM NEGATIVAMENTE NO CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa*



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Óleo essencial (OE).

4.9.1.4 Discussão dos resultados de atividade alelopática

Os principais resultados de atividade alelopática de *Myrcia hatschbachii* foram para Extrato bruto galho, Frações folha hexano e clorofórmio, Fração galho hexano e Óleo essencial, os quais inibiram o crescimento do hipocótilo em todas as concentrações; e Extratos brutos e Frações clorofórmio de folhas e galhos, os quais inibiram o crescimento da radícula em todas as concentrações. A atividade alelopática também é descrita para outras espécies do gênero *Myrcia* e envolvem estudos de inibição e estimulação da germinação e crescimento de hipocótilo e radícula.

Extrato bruto acetato etílico, extrato bruto metanólico e óleo essencial de *Myrcia guianensis* foram testados contra duas plantas daninhas e apresentaram atividade alelopática de inibição da germinação das sementes de *Mimosa pudica* (malícia), já as frações hexânica e acetato etílica apresentaram inibição de crescimento de hipocótilo e radícula. Por outro lado, o óleo essencial apresentou efeito estimulatório nas sementes de *Senna obtusifolia* (mata-pasto) (SOUZA et al., 2006).

As folhas de *Myrcia guianensis* também foram estudadas em relação às suas ações na espécie *Sorghum bicolor* (sorgo). Seus extratos inibiram drasticamente o desenvolvimento de raízes de sorgo e alteraram a expressão de genes *SHR* e *PHB* e microRNA 166, os quais podem ser utilizados como indicadores de potencial alelopático no desenvolvimento de raiz (FRANCO et al., 2015).

Estudos sugerem que a espécie *Myrcia tomentosa* poderia ser investigada para o desenvolvimento e produção de herbicidas naturais. Extrato de acetato de etila e extrato de acetona mostraram uma potente inibição do alongamento coleóptil quando testadas sobre o trigo (*Triticum aestivum*). A taxa de germinação de sementes de agrião (*Lepidium sativum* L.) e o crescimento do hipocótilo de alface (*Lactuca sativa*) também foram inibidos significativamente por extratos de diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol (IMATOMI et al., 2013).

Extratos aquosos de *Myrcia multiflora*, *Myrcia splendens* e *Myrcia tomentosa* foram avaliados em relação à atividade fitotóxica sobre a germinação e o desenvolvimento de três plantas infestantes de culturas agrícolas: *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea grandifolia*. A maioria dos extratos promoveram atrasos acentuados na germinação de sementes e inibiram o crescimento de plântulas das espécies, inclusive com efeitos mais eficientes que o herbicida oxyfluorfen (IMATOMI et al., 2015).

4.9.2 Toxicidade preliminar *in vitro*

O teste de toxicidade preliminar *in vitro* foi realizado frente à *Artemia salina*, para extratos brutos, frações e óleo essencial.

Em geral, este teste tem como finalidade ser um modelo de estudo preliminar de toxicidade em micro-organismos, bem como um direcionamento para atividades farmacológica, antitumoral, antibacteriana e estudos de ecotoxicidade.

Extratos de plantas e derivados com alta toxicidade contra a *Artemia salina* sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo útil a utilização deste bioensaio na busca de substâncias bioativas (AMARANTE et al., 2011). Além disto, o estudo é de fácil realização e baixo custo.

Os resultados, presentes na TABELA 24, foram avaliados a partir da determinação das concentrações letais CL_{50} e CL_{90} e intervalos de confiança de 95% a partir de estudos estatísticos pelo método Probitos.

TABELA 24 - TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii* EM *Artemia salina*

AMOSTRA	CL_{50} µg/mL	IC 95% µg/mL	CL_{90} µg/mL	IC 95% (µg/mL)
Sulfato de quinidina	101,03	59,52 – 154,92	356,50	222,05 – 849,74
EBF	>1000	-	>1000	-
FFH	>1000	-	>1000	-
FFC	>1000	-	>1000	-
FFA	>1000	-	>1000	-
FFR	>1000	-	>1000	-
EBG	>1000	-	>1000	-
FGH	>1000	-	>1000	-
FGC	>1000	-	>1000	-
FGA	>1000	-	>1000	-
FGR	>1000	-	>1000	-
OE	409,92	353,36 - 465,23	688,02	595,42 - 850,94

FONTE: O autor (2017).
NOTA: Concentração letal (CL), Intervalo de confiança (IC), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Extrato bruto galho (EBG), Fração galho hexano (FGH), Fração galho clorofórmio (FGC), Fração galho acetato de etila (FGA), Fração galho remanescente (FGR), Óleo essencial (OE).

Segundo Meyer et al. (1982), as amostras são consideradas tóxicas quando CL_{50} for inferior a 1000 µg/mL. Assim, considerando todas as amostras testadas, apenas o óleo essencial apresentou atividade, sendo que as demais encontram-se livres de toxicidade aos organismos avaliados.

Já Amarante et al. (2011), descreve uma classificação melhor delimitada: considera-se baixa toxicidade quando a concentração letal 50% (CL_{50}) for superior a 500 µg/mL; moderada para CL_{50} entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a CL_{50} for inferior 100 µg/mL. Segundo esta classificação, o óleo essencial de *Myrcia hatschbachii* (409,92 µg/mL) apresenta toxicidade moderada.

Esta toxicidade presente na espécie pode estar relacionada às propriedades biológicas dos compostos majoritários do óleo essencial, como atividade antibacteriana do E-Cariofileno (CASCAES et al., 2015) e antibacteriana e citotóxica do Espatulenol (LIMBERGER et al., 2004), além do sinergismo que pode ocorrer entre os constituintes.

O teste com o solvente metanol, utilizado para solubilizar as amostras, não apresentou influência sobre os microcrustáceos.

Foi realizado um estudo com método descrito pelo mesmo autor utilizando óleo essencial de folhas de *Myrcia sylvatica* e o resultado de CL_{50} foi de 79,44 µg/mL, sendo considerado altamente tóxico (ROSA et al., 2016). O óleo essencial de folhas de *Myrcia myrtifolia* também foi testado e apresentou CL_{50} de 479,16 µg/mL, sugerindo seu uso potencial como antimicrobiano (CERQUEIRA et al., 2007). Este último resultado mostrou-se bastante próximo ao encontrado para o óleo de *Myrcia hatschbachii*.

4.9.3 Atividade hemolítica *in vitro*

O ensaio de hemólise *in vitro*, realizado para extratos brutos e frações de folhas e galhos e óleo essencial de folhas, é um teste de triagem de toxicidade, pois podemos avaliar a ação da amostra sobre o rompimento de eritrócitos. A porcentagem de hemólise foi calculada frente ao Triton 1% (TABELA 25) e Água potável (TABELA 26), considerados como 100%. Os extratos brutos e frações de galhos não apresentaram atividade hemolítica, por isso seus dados não constam nas tabelas.

TABELA 25 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE AMOSTRAS DE *Myrcia hatschbachii* FRENTE AO TRITON 1%

AMOSTRA µg/mL	% HEMÓLISE ±DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
FFA 250	2,70 ±0,30	a1
FFA 500	5,28 ±0,67	a1, a2
FFA 750	5,61 ±1,75	a1, a2, a3)
FFC 250	7,27 ±0,38	a1, a2, a3, a4
EBF 250	7,34 ±1,06	a1, a2, a3, a4
FFA 1000	9,60 ±1,35	a1, a2, a3, a4, a5
FFR 250	10,30 ±0,86	a1, a2, a3, a4, a5
EBF 500	11,45 ±1,12	a1, a2, a3, a4, a5, a6
FFH 250	13,11 ±2,37	a2, a3, a4, a5, a6
EBF 750	14,86 ±4,61	a2, a3, a4, a5, a6
FFR 750	15,18 ±1,80	a2, a3, a4, a5, a6
FFR 1000	15,46 ±0,36	a3, a4, a5, a6
FFR 500	15,60 ±1,27	a4, a5, a6
EBF 1000	16,16 ±3,45	a4, a5, a6
Saponina 100	18,70 ±2,15	a5, a6, a7
FFC 500	20,31 ±3,05	a6, a7, a8
OE 250	26,85 ±2,53	a7, a8, a9
FFC 750	29,38 ±4,18	a8, a9, a10
FFC 1000	32,74 ±7,60	a9, a10
FFH 500	34,21 ±6,23	a9, a10
FFH 750	36,93 ±6,13	a10, a11
OE 500	38,15 ±2,07	a10, a11
OE 750	45,65 ±6,75	a11, a12
FFH 1000	52,92 ±4,03	a12, a13
OE 1000	53,55 ±6,00	a12, a13
Saponina 250	60,47 ±4,68	a13
Saponina 500	83,95 ±2,55	a14
Saponina 1000	84,38 ±6,28	a14
Saponina 750	84,53 ±2,04	a14
Triton 1%	100	a15

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

TABELA 26 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE AMOSTRAS DE *Myrcia hatschbachii* FRENTE À ÁGUA POTÁVEL

AMOSTRA µg/mL	% HEMÓLISE ±DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE TUKEY
FFA 250	2,47 ±0,28	a1
FFA 500	4,82 ±0,61	a1, a2
FFA 750	5,14 ±1,61	a1, a2, a3
EBF 250	6,72 ±0,97	a1, a2, a3, a4
FFC 250	7,09 ±0,37	a1, a2, a3, a4
FFA 1000	8,80 ±1,24	a1, a2, a3, a4, a5
FFR 250	9,44 ±0,79	a1, a2, a3, a4, a5
EBF 500	10,48 ±1,02	a1, a2, a3, a4, a5, a6
FFH 250	11,95 ±2,16	a2, a3, a4, a5, a6
EBF 750	13,59 ±4,21	a2, a3, a4, a5, a6
FFR 750	13,90 ±1,65	a2, a3, a4, a5, a6
FFR 1000	14,15 ±0,33	a2, a3, a4, a5, a6
FFR 500	14,29 ±1,17	a3, a4, a5, a6
EBF 1000	14,78 ±3,16	a4, a5, a6
Saponina 100	17,97 ±2,07	a5, a6, a7
FFC 500	19,80 ±2,97	a6, a7, a8
OE 250	25,80 ±2,43	a7, a8, a9
FFC 750	28,63 ±4,08	a8, a9, a10
FFH 500	31,19 ±5,67	a9, a10
FFC 1000	31,91 ±7,41	a9, a10
FFH 750	33,67 ±5,58	a9, a10
OE 500	36,66 ±1,99	a10, a11
OE 750	43,87 ±6,48	a11, a12
FFH 1000	48,25 ±3,68	a12
OE 1000	51,46 ±5,77	a12, a13
Saponina 250	58,11 ±4,50	a13
Saponina 500	80,68 ±2,45	a14
Saponina 1000	81,09 ±6,04	a14
Saponina 750	81,23 ±1,96	a14
Água	100	a15

FONTE: O autor (2017).
NOTA 1: Desvio Padrão (DP), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE).
NOTA 2: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

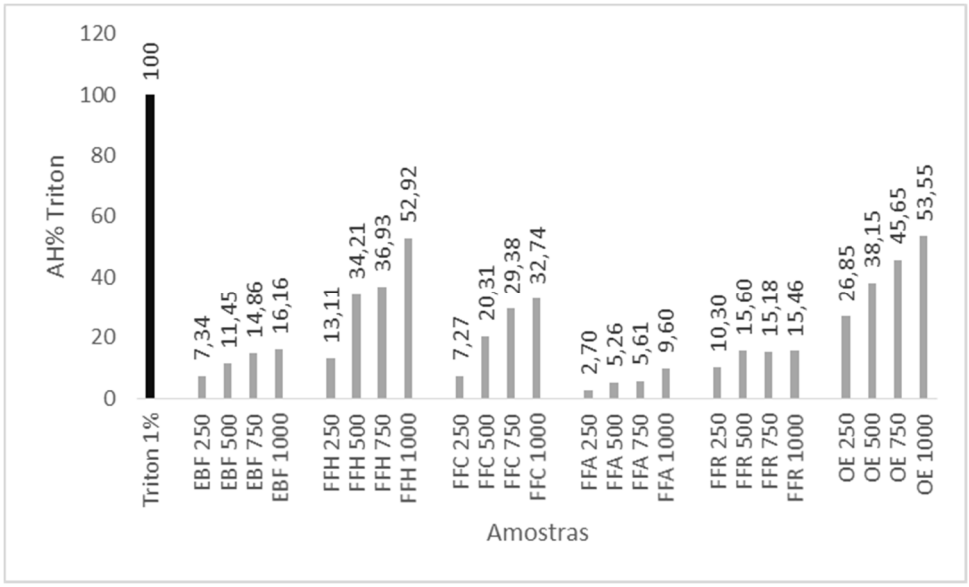
De acordo com as tabelas, pode-se observar que as amostras que apresentaram atividade hemolítica foram as obtidas a partir das folhas: Extrato bruto, Frações e Óleo essencial, tendo como característica serem doses dependentes, exceto pela Fração Remanescente que apresentou um platô a partir da concentração de 500 µg/mL. Nesta dose dependência, nota-se o aumento da atividade hemolítica em decorrência do aumento da concentração testada. Já as amostras preparadas a partir de material vegetal obtido de galhos, não apresentaram atividade.

A hemólise também foi testada com a Saponina, a qual é um metabólito com atividade conhecida e descrita na literatura, por isso foi utilizada no teste como padrão

fitoquímico. Estas substâncias são altamente ativas, sendo capazes de causar hemólise dos glóbulos vermelhos com liberação de hemoglobina, mesmo quando muito diluídas (KARABALIEV; KOCHEV, 2003).

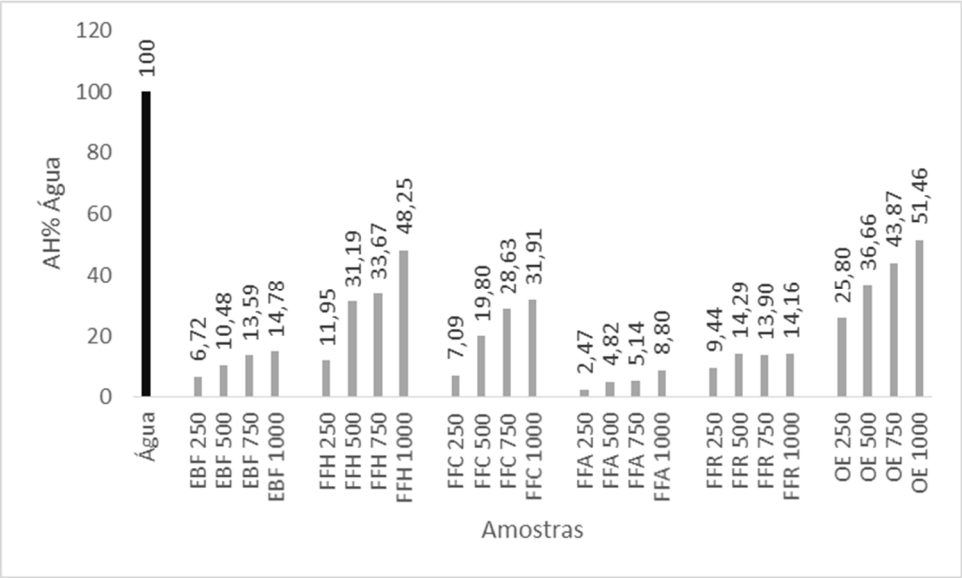
Dentre as amostras que se mostraram hemolíticas, as que mais se aproximaram estatisticamente dos controles Triton 1% e Água potável foram a Fração folha hexano e o Óleo essencial, ambos na concentração de 1000 µg/mL, com resultados de atividade na faixa de 50%. Uma melhor visualização destes resultados está representada nos GRÁFICO 15 e GRÁFICO 16.

GRÁFICO 15 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO TRITON 1%



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Atividade hemolítica (AH%), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

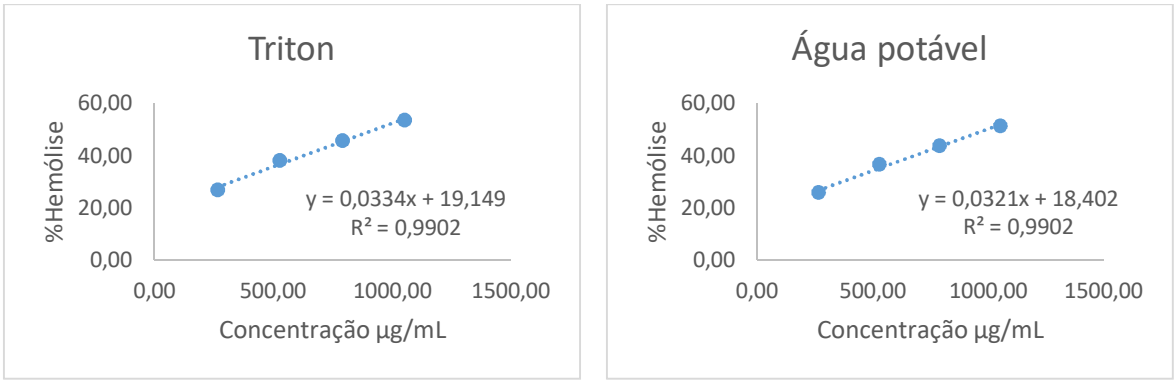
GRÁFICO 16 - CAPACIDADE HEMOLÍTICA DAS AMOSTRAS COMPARADAS À ÁGUA POTÁVEL



FONTE: O autor (2017).
NOTA: Atividade hemolítica (AH%), Extrato bruto folha (EBF), Fração folha hexano (FFH), Fração folha clorofórmio (FFC), Fração folha acetato de etila (FFA), Fração folha remanescente (FFR), Óleo essencial (OE) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Para o óleo essencial, por regressão linear, foi possível o cálculo da concentração hemolítica capaz de causar 50% de hemólise (HC_{50}). Assim, foi plotado um gráfico em que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da porcentagem de Hemólise das amostras de cada concentração. O GRÁFICO 17 apresenta as curvas de calibração utilizadas para a determinação da HC_{50}. Os resultados desta determinação foram de 923,68 µg/mL para Triton 1% e de 984,36 µg/mL para Água potável.

GRÁFICO 17 - CURVAS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia hatschbachii*



FONTE: O autor (2017).

5 CONCLUSÃO

As análises morfoanatômicas e histoquímicas de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand auxiliaram na descrição e caracterização da espécie e também em sua correta identificação. Já os screenings realizados por marcha fitoquímica apresentaram os principais metabólitos encontrados, compreendendo esteroides e/ou triterpenos, taninos e cumarinas.

O óleo essencial, obtido a partir das folhas da espécie, foi extraído por hidrodestilação por arraste de vapor d'água e apresentou rendimento de 0,17%. A identificação dos constituintes químicos mostrou a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo trans-Calameneno, E-Cariofileno e Espatulenol os compostos majoritários. O extrato bruto e frações de folhas e galhos foram obtidos por Soxhlet, e juntamente com o óleo essencial, foram realizadas as atividades biológicas e antioxidantes. A partir da fração folha acetato de etila, foram isolados e identificados cristais de ácido gálico.

Os ensaios de atividade antioxidante mostraram resultados significativos para todas as amostras nos dois métodos testados, Formação do complexo fosfomolibdênio e Redução do radical DPPH•.

Nos estudos de toxicidade, apenas o óleo essencial apresentou-se tóxico contra a *Artemia salina*, sendo esta atividade considerada como moderada. Já no teste de hemólise, as amostras obtidas a partir de folhas apresentaram atividade, sendo as maiores atribuídas a fração hexano e óleo essencial, ambos na concentração de 1000 µg/mL e com resultados na faixa de 50%.

Os resultados de atividade alelopática foram relevantes na inibição do crescimento de *Lactuca sativa*, com destaque para Extrato bruto galho, Frações folha hexano e clorofórmio, Fração galho hexano e Óleo essencial, os quais inibiram o crescimento do hipocótilo em todas as concentrações e Extratos brutos e Frações clorofórmio de folhas e galhos, os quais inibiram o crescimento da radícula em todas as concentrações.

Considerando todas as atividades testadas, a fração folha acetato de etila foi a que mais se destacou. A fração mostrou resultados de propriedade antioxidante mais expressivos que os padrões Ácido ascórbico, Rutina e BHT. Além disto, esta amostra não foi considerada tóxica frente à *Artemia salina* e foi a que apresentou os menores resultados de atividade hemolítica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A família Myrtaceae e o gênero *Myrcia* são amplamente conhecidos por suas propriedades biológicas, usos populares e obtenção de óleo essencial. O estudo de *Myrcia hatschbachii* D. Legrand, uma espécie desta importante família, contribui com a pesquisa de metabólitos a partir de plantas da biodiversidade brasileira pouco explorada, e incentiva a busca por novas atividades aplicadas às ciências farmacêuticas, agronômicas e alimentícias.

Os resultados obtidos para a espécie pesquisada são inéditos na avaliação de atividades biológicas e isolamento e identificação de substâncias químicas. Seu único ensaio referenciado na literatura diz respeito a análise de composição de óleo essencial, comparado à outras espécies do gênero *Myrcia*. Assim, considerando a presença do constituinte ácido gálico, as propriedades antioxidante e alelopática demonstradas pelos extratos brutos e frações, bem como a toxicidade do óleo essencial, estudos de aplicações diversas podem ser aprofundados posteriormente para o enriquecimento da pesquisa desta espécie.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream IL: Allured Publishing, 2007.

ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta daninha**, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.

AKINNUBI, M. F.; et al. Petiole anatomy of some species of Asteraceae in southwest Nigeria. **African Journal of Plant Science**, v.7, n.12, p.608-612, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p.431-434, 2011.

ANDRADE, G. S.; GUIMARÃES, A. G.; SANTANA, M. T.; SIQUEIRA, R. S.; PASSOS, L. O.; MACHADO, S. M. F.; RIBEIRO, A. S.; SOBRAL, M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 181–188, 2012.

ARANTES, A. A.; MONTEIRO, R. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v.3, n.2, p.111-127, 2002.

ARNON, D. I. Copper enzimes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, 1949.

ASTHANA, N.; YADAV, S. P.; GHOSH, J. K. Dissection of antibacterial and toxic activity of Melittin a leucine zipper motif plays a crucial role in determining its hemolytic activity but not antibacterial activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55042-55050, 2004.

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, p. 27540–27557, 2015.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-biological interactions**, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008.

BANTHORPE, D. V.; CHARLWOOD, B. V.; FRANCIS, M. J. O. The biosynthesis of monoterpenes. **Chemical Reviews**, n. 72, p. 115–155, 1972.

BARNES, J. P.; PUTNAN, A. R.; BURKE, B. A.; AASEN, A. J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p.1385-1390, 1987.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

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

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

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 93-99, 2003.

BOBEK, V. B.; et al. Comparative pharmacobotanical analysis of *Baccharis caprariifolia* DC. and *B. erioclada* DC. from Campos Gerais, Paraná, Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.34, n.7, p. 1396-402, 2015.

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. p. 399.

BRAZ, D. M.; MOURA, M. V. L. P.; ROSA, M. M. T. Chave de identificação para as espécies de dicotiledôneas arbóreas da Reserva Biológica de Tinguá, RJ, com base em caracteres vegetativos. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 225-240, 2004.

BRIGGS, B. G.; JOHNSON, L. A. S. Evolution in the Myrtaceae - Evidence from inflorescence structure. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 102, n. 4, p. 157-254, 1979.

CAN, O. D.; TURAN, N.; OZKAY, U. D.; OZTURK, Y. Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. **Life Sciences**, v. 190, p. 110–117, 2017.

CÂNDIDO, C. S.; PORTELLA, C. S. A.; LARANJEIRA, B. J.; DA SILVA, S. S.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, M. P. S.; GOMES, A. G.; ALMEIDA, P. C.; CARVALHO, C. B. M. Effects of *Myrcia ovata* Cambess, essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganims and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 4, p. 621-627, 2010.

CAPUTO, L. F. F.; GITINARA, L. DE B.; MANSO, P. P. DE A. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2011. v. 2. p. 123-130.

CARVALHO, J. L. DE S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. DE F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema de Soxhlet modificado. **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031–1035, 2009.

CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. DE A.; ZOGHBI, M. DAS G. B.; SANTOS, L. DA S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881–904, 2015.

CERQUEIRA, M. D. DE; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CERQUEIRA, M. D. DE; MARQUES, E. DE J.; MARTINS, D.; et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 10, p. 1544–1548, 2009.

CHON, S. U.; JANG, H. G.; KIM, D. K.; KIM, Y. M.; BOO, H. O.; KIM, Y. J. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v. 106, n. 3, p. 309-317, 2005.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 8. ed. 2009. M7-A8.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. The Leaf Oil Composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 11, n. 1, p. 41 – 44, 2008.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

CRUZ, A. V. DE M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2004.

DIAS, J. DE F. G.; CÍRIO, G. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Contribution to the allelophatic study of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 220-223, 2005.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Morfo-anatomia foliar de *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 43-51, 2011.

FARRUGIA, L. WinGX and ORTEP for Windows: an update. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. 4, p. 849-854, 2012.

FEO, V. DE; SIMONE, F. DE; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 573-578, 2002.

FERREIRA, A. C. F.; NETO, J. C.; SILVA, A. C. M.; KUSTER, R. M.; CARVALHO, D. P. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 351–355, 2006.

FERREIRA, E. A.; GRIS, E. F.; FELIPE, K. B.; CORREIA, J. F. G.; FERREIRA, E. C.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C. Potent hepatoprotective effect in CCl4-induced hepatic injury in mice of phloroacetophenone from *Myrcia multiflora*. **Lybian Journal of Medicine**, v. 5, 2010.

FERREIRA, E. A; GRIS, E. F.; REBELLO, J. M.; CORREIA, J. F. G.; OLIVEIRA, L. F. S.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C. The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isolated from *Myrcia multiflora* has antiobesity and mixed hypolipidemic effects with the reduction of lipid intestinal absorption. **Planta Medica**, v. 77, n. 14, p. 1569–1574, 2011.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, M. I. D. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiências**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2006.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FRANCO, D. M.; SALDANHA, L. L.; SILVA, E. M.; et al. Effects of leaf extracts of *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC.: on growth and gene expression during root development of *Sorghum bicolor* (L .) Moench. **Allelophathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 237–248, 2015.

FUCHS, C. H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology,** v. 38, p. 141-144, 1963.

GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; SUŁKOWSKI, M.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYZ, J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – *In vitro* study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 154-160, 2013.

GHANI, U. Re-exploring promising alfa-glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 133–162, 2015.

GOMES, S. M.; SOMAVILLA, N. S. D. N.; GOMES-BEZERRA, K. M.; DE MIRANDA, S. DO C.; DE-CARVALHO, P. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 223-238, 2009.

GONZÁLEZ, M. F.; GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. α-Glucosidase and α-amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 322-327, 2016.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, 2006.

GULDBRANDSEN, N.; DE MIERI, M.; GUPTA, M.; SEISER, T.; WIEBE, C.; DICKHAUT, J.; REINGRUBER, R.; SORGENFREI, O.; HAMBURGER , M. Screening of Panamanian Plant Extracts for Pesticidal Properties and HPLC-Based Identification of Active Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, p. 353–367, 2015.

HUANG, M.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana*, the sesquiterpene β-caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, p. 997–1008, 2012.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MATOS, A. P.; et al. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 29–35, 2013.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; MIRANDA, M. A. F. M.; GUALTIERI, S. C. J. Phytotoxic effects of aqueous leaf extracts of four Myrtaceae species on three weeds. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 241-248, 2015.

JANG, A; LEE, N. Y.; LEE, B. D.; KIM, T. H.; SON, J. H.; AN, B. J.; JO, C. Biological functions of a synthetic compound, octadeca-9,12-dienyl-3,4,5-hydroxybenzoate, from gallic acid–linoleic acid ester. **Food Chemistry**, v. 112, p. 369–373, 2009.

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

JOLY, C. A; VERDADE, M.; BERLINCK, R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista Usp**, v. 89, p. 114–133, 2011.

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

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v.88, p.101-105, 2003.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508-536, 1997.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 13–39, 2012.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES, P. G. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **ATLA - Alternatives to laboratory animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. In: S.P. Colowick & N.O. Kaplan (eds.). **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIMA, M. A. A.; OLIVEIRA, F. F. M.; GOMES, G. A.; LAVOR, P. L.; SANTIAGO, G. M. P.; NAGAO-DIAS, A. T.; ARRIAGA, A. M. C.; et al. Evaluation of larvicidal activity of the essential oils of plants from Brazil against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 11716–11720, 2011.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quimica Nova**, v. 27, n. 6, p. 916–919, 2004.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MENSOR, L. L.; et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1979.

MEYER, B. N.; et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituints. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. 2003. Apostila da disciplina de Fitoquímica – Universidade Federal do Paraná, Farmácia, Curitiba, 2003.

MORAIS RODRIGUES, M. C. DE; BORGES, L. L.; MARTINS, F. S.; MOURÃO, R. H. V.; CONCEIÇÃO, E. C. DA. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) leaves. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 45, p. 9–12, 2016.

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

MORESCO, H. H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L. C.; et al. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2014.

O'BRIEN, T. P; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma,** v. 59, p. 368-373, 1964.

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

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

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

PEREIRA, R. A.; ZOGHBI, M. G. B.; BASTOS, M. N. C. Essential oils of twelve species of Myrtaceae growing wild in the sandbank of the Resex Maracanã, State of Pará, Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, p. 440–450, 2010.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, n. 1, p. 45–61, 2002.

PINTO, A. C.; ZUCCO, C.; GALEMBECK, F.; ANDRADE, J. B. DE; VIEIRA, P. C. Química sem fronteiras. **Quimica Nova**, v. 35, n. 10, p. 2092–2097, 2012.

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

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. **Food Chemistry**, v. 220, p. 93–99, 2017.

REIGOSA, M.; GOMES, A. S.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Basilica**, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013.

RETAMALES, H. A.; SCHARASCHKIN, T. Comparative leaf anatomy and micromorphology of the Chilean Myrtaceae: Taxonomic and ecological implications. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 217, p. 138–154, 2015.

REZENDE, W. P.; BORGES, L. L.; ALVES, N. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Chemical variability in the essential oils from leaves of *Syzygium jambos*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 433–440, 2013.

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

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, n.1, p.19-26, 2016.

ROSA, P. O.; ROMERO, R. O gênero *Myrcia* (Myrtaceae) nos campos rupestres de Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, p. 613–633, 2012.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SALVADOR, M. J.; LOURENÇO, C. C. DE; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C.; STEFANELLO, M. E. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 977-82, 2011.

SANTIAGO, J. A.; CARDOSO, M. G.; DA CRUZ, F. A.; PALMIERI, M. J.; SOUZA, R. V. DE; SOARES, L. I.; CAMPOS, J. M. S. DE; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cytogenotoxic effect of essential oil from *Backhousia citriodora* L. (Myrtaceae) on meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 515–520, 2017.

SANTOS, G. C. M.; GOMES, G. A.; GONÇALVES, G. M.; SOUSA, L. M.; SANTIAGO, G. M. P.; CARVALHO, M. G.; MARINHO, B. G. Essential oil from *Myrcia ovata*: Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice. **Planta Medica**, v. 80, p. 1588–1596, 2014.

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

SERPELONI, J. M.; SPECIAN, A. F. L.; RIBEIRO, D. L.; TUTTIS, K.; VILEGAS, W.; LÓPEZ, W. M.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA; E. A. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. In normal and tumor gastric cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 345-355, 2015.

SILVA, A. N. **Estudo da composição química e da atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais em espécies do gênero *Myrcia* D. C. (Myrtaceae).** 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Biotecnologia, Feira de Santana, 2010.

SILVA, A. N.; UETANABARO, A. P. T; LUCCHESE, A. M. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 2, p. 269 – 27, 2013.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 14–18, 2014.

SILVA, F. K. S.; ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. S.; ZOGHBI, M. G. B. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazônica**, v. 5, n. 1, p. 7–15, 2015.

SILVEIRA, L. A. **Morfoanatomia da folha de *Myrcia rostrata* DC. (Myrtaceae): uma espécie com potencial medicinal.** 2007. 41 p. Monografia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Ciências Biológicas e Botânica, Rio de Janeiro, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBRAL, M. **A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Unisinos, 2003.

SOBRAL, M. Uma nova espécie e duas novas combinações em Myrtaceae do Brasil. **Lundiana**, v. 9, n. 2, p. 107–110, 2008.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10701>. Acesso em: 25 abr. 2016.

SOUSA, L. A. F.; MOURA, V. M.; RAPOSO, J. D. A.; SOUSA, L. F.; OLIVEIRA, R. B.; SANTOS, L. S.; ARAÚJO, R. N. M.; SILVA, A. M. M.; ARANHA, E. P.; SUEMITSU, C.; GUERRA, C. E.; CHALKIDIS, H. M.; PACHECO, S.; MOURÃO, R. H. V. The effect of the aqueous extract of *Myrcia guianensis* (Aubl) DC and its fractions against the hemorrhagic activity of *Bothrops jararaca* venom. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 42, p. 3139–3146, 2013.

SOUZA, A. P. S. F.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

STEFANELLO, M. E. A.; CERVI, A. C.; WISNIEWSKI, A. Jr.; SIMIONATTTO, E. L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O.Berg) Kiaersk. var. obtecta, Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 82–86, 2010.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73-94, 2011.

STEFANELLO, M. E. A.; RIVA, D.; SIMIONATTTO, E. L.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SALVADOR, M. J. Chemical composition and cytotoxic activity of essential oil from *Myrcia laruotteana* fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 7–10, 2011.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p.1423-26, 1967.

SUGDEN, A. M. Leaf anatomy in a Venezuelan Montana forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 4, p. 231-41, 1985.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, L.; GUALTIERI. S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

THOMAS, L. H.; WALES, C.; WILSON, C. C. Selective preparation of elusive and alternative single component polymorphic solid forms through multi-component crystallisation routes. **Chemical Communications**, v. 52, p. 7372—7375, 2016.

VASCONCELOS, T. N. C.; PRENNER, G.; BÜNGER, M. O.; et al. Systematic and evolutionary implications of stamen position in Myrteae (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 179, n. 3, p. 388–402, 2015.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental toxicology and pharmacology**, n. 35, p. 473-485, 2013.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S. Essential oils from three *Myrcia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, p. 421–424, 2003.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. II. Aldose Reductase and α-Glucosidase Inhibitors from Brazilian Natural Medicine, the Leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of Myrciacitrins I and II and Myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 11, p. 113-119, 1998.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 147–152, 2001.

WAGNER, H. **Plant Drugs analysis**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996. p. 298-299 e 319-319.

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

WILSON, P. **Myrtaceae. In: Kubitzki, K. (Eds.). The families and genera of vascular plants.** Flowering plants Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer-Verlag, Heidelberg, vol. X, p. 212–271, 2011.

WOSCH, L.; et al. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n.4, p. 328-343, 2015.

WUBSHET, S. G.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, I. M. C.; STAERK, D. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC–HRMS–SPE– NMR: α-Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). **Phytochemistry**, v. 116, p. 246-252, 2015.

ANEXO 1 - AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela**:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF n.º 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa *"Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais"*.

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto n.º 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
Presidente